

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Lea Tomášová

**Vliv inhibice SH3 domény proteinu Crk na invazivitu nádorových
buněk**

The effect of Crk SH3 domain inhibition in invasiveness of cells

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Daniel Rösel, Ph.D.

Praha, 2015

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci “Vliv inhibice SH3 domény proteinu Crk na invazivitu nádorových buněk” zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 4. května 2015

.....

Bc. Lea Tomášová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala všem, kteří se svým vedením, cennými radami a připomínkami podíleli na vzniku mé diplomové práce, především svému školiteli doc. RNDr. Danielu Röselovi, Ph.D. Dále pak doc. RNDr. Janu Brábkovi, Ph.D. a Mgr. Jakubovi Gemperlemu, Ph.D. a v neposlední řadě i všem ostatním členům laboratoře invazivity nádorových buněk. Mgr. Ondřeji Toldemu, Ph.D. děkuji za pomoc při konfokální mikroskopii.

Svůj dík bych chtěla vyjádřit také své rodině a přátelům, kteří pro mě po dobu vzniku této práce byli podporou.

ABSTRAKT

Protoonkogen Crk je spojován s nádory s agresivním a invazivním potenciálem. Protein Crk patří do skupiny adaptorových proteinů obsahujících SH2 a SH3 domény a hraje důležitou roli v buněčné signalizaci. Přes svoji SH2 doménu integruje signál přicházející od aktivovaných receptorů růstových faktorů a integrinů a předává jej na proteiny vázající jeho SH3 doménu. Ty potom aktivují malé GTPázy Rac1, Rap1 a Ras, které se podílí na regulaci buněčného pohybu, proliferace a přežívání. Cílem této diplomové práce bylo blokovat signalizaci proteinu Crk inhibicí jeho SH3 domény pomocí kompetitivního peptoidu, který váže SH3 doménu proteinu Crk s vysokou afinitou. Vazba tohoto inhibitoru na SH3 doménu brání navázání jejích buněčných vazebných partnerů a blokuje tak následný přenos signálu. V této diplomové práci byl analyzován vliv inhibice SH3 domény proteinu Crk na invazivní vlastnosti nádorových buněk. Pozorovaný inhibiční efekt na buněčnou invazivitu a schopnost buněk růst nezávisle na podkladu přináší důkaz o terapeutické relevanci cílení SH3 domény proteinu Crk pomocí peptoidového inhibitoru.

KLÍČOVÁ SLOVA:

SH3 doména, Crk, nádorová transformace, nádorová léčba

ABSTRACT

Protooncogene Crk was found to be upregulated in tumours with aggressive and invasive potential. The adaptor protein Crk has an important role in cell signaling: it integrates signals from activated integrins and growth factors receptors via its SH2 domain and transmits the signal to its SH3 domain binding partners that activates the small GTPases Rac1, Rap1 and Ras. This leads to regulation of cell migration, proliferation and survival. The aim of this thesis project was to inhibit the Crk dependent signaling by a competitive inhibition of the Crk SH3 domain, using a high affinity CrkSH3 binding peptoid. Binding of the inhibitor to the Crk SH3 domain prevents binding of cellular Crk SH3 interaction partners and the corresponding signal transmission is impaired. In this thesis project the effect of the Crk SH3 inhibition on the invasiveness of cancer cells was analyzed. The observed inhibitory effect on cell invasion as well as on anchorage independent growth provides a proof of therapeutical relevance of targeting CrkSH3N domain by peptoid-based inhibitors.

KEY WORDS:

SH3 domain, Crk, tumor transformation, anti-cancer therapy

OBSAH

Obsah	5
Seznam zkratek	7
1. Úvod	9
2. Cíl práce	10
3. Literární přehled	11
3.1. Adaptorový protein Crk jako historický mezník na cestě k pochopení mechanismu signální transdukce	11
3.2. Struktura a funkce proteinu Crk	13
3.2.1. Regulace aktivity proteinu Crk a rozdíl v signalizaci jednotlivých izoform	15
3.3. Protein Crk a nádorová onemocnění	19
3.3.1. miRNA-126 a regulace hladiny Crk	19
3.4. Role proteinu Crk v invazivitě nádorových buněk	21
3.4.1. Signální komplex p130Cas/Crk - molekulární spínač migrace	21
3.4.2. Aktivace malých GTPáz Rac, Rap1 a RhoA	22
3.4.3. Další proteiny kooperující s Crk na indukci invazivity	23
3.5. Protein Crk jako možný cíl terapeutické strategie	26
3.5.1. Struktura SH3 domény a její vazebný motiv	26
3.5.2. Od vazebného motivu k vysokoafinním ligandům - cesta k nalezení ideálního inhibitoru CrkSH3N domény	28
3.5.3. Inhibice signalizace proteinu Crk cílením SH3N domény	30
4. Materiál	32
4.1. Organismy	32
4.1.1. Bakterie	32
4.1.2. Savčí buněčné linie	32
4.2. Kultivační média	32
4.2.1. Média pro kultivaci bakterií	32
4.2.2. Média pro kultivaci savčích buněčných linií	33
4.3. Materiál pro práci s DNA	33
4.3.1. Plazmidy	33
4.3.2. Izolace plazmidové DNA	34
4.3.3. Agarózová elektroforéza	34
4.3.4. Štěpení a ligace	35
4.4. Materiál pro práci s proteiny	35
4.4.1. Purifikace proteinů, vazebné analýzy	35
4.4.2. Materiál pro přípravu lyzátů a mikroskopických preparátů	36
4.4.3. Materiál pro SDS-PAGE elektroforézu a Western blot	37
4.4.4. Materiál používaný při buněčných analýzách	38
4.4.5. Inhibitor CrkSH3N domény	39
5. Metody	41
5.1. Molekulární klonování	41
5.1.1. Izolace plazmidové DNA	41
5.1.2. Elektroforéza DNA v agarózovém gelu	43

5.1.3.	Štěpení DNA restrikčními endonukleázami	43
5.1.4.	Ligace fragmentů DNA s přesahujícími konci	44
5.1.5.	Transformace bakterií pomocí elektroporace	44
5.2.	Afinitní purifikace GST-fúzních proteinů	44
5.3.	Analýza afinity fluorescenčně značeného inhibitoru k SH3 doménám	46
5.4.	Stanovení hodnoty IC ₅₀	47
5.5.	Kultivace savčích buněk	48
5.5.1.	Rozpěstování buněk ze stabilátů	48
5.5.2.	Pasážování savčích buněk	49
5.5.3.	Příprava stabilátů	49
5.6.	Příprava mikroskopických preparátů ze savčích buněk	49
5.7.	Příprava lyzátů ze savčích buněk	50
5.8.	Stanovení koncentrace proteinů - Folinova metoda	51
5.9.	SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)	52
5.10.	Western blot	53
5.11.	Imunodetekce proteinů na membráně	53
5.12.	Buněčné analýzy	54
5.12.1.	Invazivita buněk ve 3D kolagenu	54
5.12.2.	Migrace buněk ve 2D prostředí - „wound-healing“ test	55
5.12.3.	Analýza cytotoxicity inhibitoru - alamarBlue® test	56
5.12.4.	Analýza schopnosti buněk růst bez ukotvení k podkladu	57
5.12.5.	Zymografie	58
5.13.	Statistická analýza dat	59
6.	Výsledky	60
6.1.	Efekt inhibice CrkSH3N na invazivitu buněk	60
6.2.	Analýza cytotoxicity inhibitoru CrkSH3N domény	62
6.3.	Vliv inhibitoru CrkSH3N domény na migraci buněk	63
6.4.	Vliv inhibice CrkSH3N domény na schopnost buněk růst nezávisle na podkladu	64
6.5.	Inhibice CrkSH3N a produkce matrixových metaloproteáz	66
6.6.	Fosforylace substrátů kinázy Src	67
6.7.	Ověření vstupu inhibitoru CrkSH3N domény do buněk	68
6.7.1.	Pozorování CrkFI v buňkách	68
6.7.2.	Analýza intenzity fluorescence CrkFI v buněčných lyzátech	69
6.8.	Analýza vazebných vlastností inhibitoru CrkSH3N	70
6.8.1.	Ověření selektivity vazby CrkFI na CrkSH3N doménu	71
6.8.2.	Stanovení hodnoty IC ₅₀	72
7.	Diskuze	74
7.1.	Inhibice CrkSH3N domény snižuje invazivní potenciál buněk a jejich schopnost růst nezávisle na podkladu	74
7.2.	Vlastnosti kompetitivního inhibitoru CrkSH3N	80
7.3.	Další směřování projektu	82
8.	Shrnutí	83
	Seznam použité literatury	84

SEZNAM ZKRATEK

Abl	nereceptorová tyrozín protein-kináza; <i>Abelson leukemia viral oncogene homolog</i>
AP-1	transkripční faktor; <i>activator protein 1</i>
ARAP3	RhoA; <i>Arf-GAP with Rho-GAP domain, ANK repeat and PH domain-containing protein</i>
Arp2/3	aktin-nukleační komplex; <i>actin related protein 2/3</i>
ASV-1	ptačí retrovirus; <i>Avian sarcoma virus-1</i>
BCAR1	lidský homolog proteinu p130Cas; <i>breast cancer antiestrogen related1</i>
Bcr-Abl	fúzní onkogenní protein vznikající v důsledku Philadelphské translokace chromozomů 22 a 9; <i>breakpoint cluster region - Abelson leukemia viral oncogene homolog</i>
c-Crk	buněčný homolog proteinu Crk
C3G	GEF pro Rap1; <i>Crk SH3-binding guanine nucleotide releasing factor</i>
CB	SH3-vazebný motiv proteinu C3G; <i>Crk-binding</i>
CDC42	malá GTPáza rodiny Rho; <i>cell division control protein 42</i>
CML	chronická myeloidní leukémie
CPPs	penetrační peptidy; <i>cell penetrating peptides</i>
Crk	protoonkogen Crk, adaptorový protein; <i>CT10 regulator of kinase</i>
Crki	kompetitvní inhibitor Crk SH3N domény
CrkFi	fluorescenčně značený kompetitvní inhibitor Crk SH3N domény
CrkL	protein rodiny Crk; <i>Crk-like</i>
CrkSH3	SH3 doména proteinu Crk
Csk	nereceptorová tyrozín protein-kináza; <i>C-terminal Src kinase</i>
CT10	ptačí retrovirus; <i>chicken tumour 10 virus</i>
Dock180	GEF pro Rac1; <i>dedicator of cytokinesis</i>
EGFL7	<i>Epidermal Growth Factor-like domain-containing protein 7</i>
ELMO	rodina adaptorových proteinů; <i>engulfment and cell motility protein</i>
ER	estrogenové receptory
Erk	protein kinázy rodiny MAPK; <i>extracellular-signal-regulated kinases</i>
FAK	nereceptorová tyrozín protein-kináza; <i>focal adhesion kinase</i>
Gab1	adaptorový protein; <i>GRB2-associated binding protein 1</i>
GDP	guanosin-difosfát
GEF	guanin nukleotid výměnný faktor; <i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	zelený fluorescenční protein
Grb	adaptorový protein; <i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	guanosin-trifosfát
HACBPs	vysokoafinní CrkSH3N-vazebné peptidy; <i>High-Affinity Crk Binding Peptides</i>

HAGBPs	vysokoafinní Grb2SH3-vazebné peptidy; <i>High-Affinity Grb Binding Peptides</i>
IRS-1	adaptorový protein; <i>insulin receptor substrate 1</i>
JNK	protein kinázy rodiny MAPK; <i>c-Jun N-terminal kinases</i>
K_D	diosociační konstanta
MAPK	rodina protein kináz; <i>mitogen-activated protein kinases</i>
miR-126	micro-RNA 126
MMPs	matrixové metaloproteázy
Nck	adaptorový protein; <i>non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1</i>
p130Cas	adaptorový protein fokálních adhezi; <i>Crk-associated substrate</i>
PDGF	růstový faktor; <i>platelet-derived growth factor</i>
PI3	fosfoinositid 3-kináza
PPI	polyprolynový motiv I. třídy
PPII	polyprolynový motiv II. třídy
Pro, P	aminokyselina prolin
PTB	modulární protein-vazebná doména; <i>phosphotyrosine-binding domain</i>
pTyr, pY	aminokyselina fosfotyrozín
Rac	GTPáza rodiny Rho; <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Rap1	GTPáza rodiny Ras; <i>Ras-related protein 1</i>
Ras	rodina malých GTPáz; <i>Rat sarcoma</i>
Rho	rodina malých GTPáz; <i>Ras homolog gene family</i>
RhoA	GTPáza rodiny Rho; <i>Ras homolog gene family, member A</i>
ROCK	protein kináza; <i>Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase</i>
SH2	modulární protein-vazebná doména; <i>Src homology 2</i>
SH3	modulární protein-vazebná doména; <i>Src homology 3</i>
SH3C	C-terminální SH3 doména
SH3N	N-terminální SH3 doména
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Sos	GEF pro Ras; <i>Son of sevenless</i>
v-crk	virový homolog Crk
Wave	protein rodiny WASp; <i>Wiscott-Aldrich syndrome protein family member 1</i>

1. ÚVOD

Schopnost nádorových buněk vytvářet sekundární ložiska - metastázy - je nejproblematictější aspektem rakovinných onemocnění. Zisk invazivního fenotypu umožňuje buňkám opustit primární nádor, invadovat okolní tkáň a proniknout do krevního řečiště, kterým se pak dostávají na místo vzniku sekundárního nádoru. U několika typů nádorů s vysoce metastatickým potenciálem byla pozorována deregulace proteinu Crk. Zvýšená hladina tohoto protoonkogenu je markerem agresivních nádorů se špatnou prognózou. Crk je protein běžně exprimovaný ve všech tkáních. Zvýšení jeho exprese uděluje buňkám zvýšenou schopnost migrace, invazivity a přežívání. Crk je adaptorový protein obsahující vazebné domény SH2 a SH3, díky kterým může interagovat s dalšími proteiny. Jeho funkcí je umožňovat tvorbu signálních komplexů a zajistit tak přenos signálu v buňkách. Signální dráhy, na kterých se Crk podílí, regulují takové buněčné procesy, jako je pohyb a adheze, proliferace, přežívání, diferenciace či fagocytóza. Pro svoji účast v různých nádorových onemocněních bývá Crk často označován jako vhodný cíl protirakovinné terapie. Jednou z možností, jak inhibovat funkci adaptorových proteinů, je blokovat interakce vazebných domén a jejich buněčných interakčních partnerů pomocí kompetitivních nízkomolekulárních ligandů. Tato práce se zabývá analýzou možnosti inhibice SH3 domény proteinu Crk pomocí kompetitivního peptoidu a klade si za cíl ověřit potenciál takového inhibitoru snižovat invazivitu nádorových buněk.

2. CÍL PRÁCE

Signalizace závislá na adaptorovém proteinu Crk přispívá ke zvýšenému invazivnímu potenciálu nádorových buněk. Cílem této diplomové práce je zablokovat tuto signalizaci kompetitivní inhibicí N-terminální domény proteinu Crk pomocí vysokoafinního peptoidu a analyzovat potenciál peptoidu inhibovat invazivní vlastnosti buněk transformovaných Src a lidských nádorových buněk. Protoonkogen Crk je spojován s nádory s agresivním a metastatickým fenotypem a je označován jako možný cíl protirakovinné terapie. Kompetitivní inhibitor CrkSH3 domény schopný snížit invazivitu nádorových buněk a tudíž metastatický potenciál nádorů by tedy mohl nalézt uplatnění v terapeutické strategii.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Adaptorový protein Crk jako historický mezník na cestě k pochopení mechanismu signální transdukce

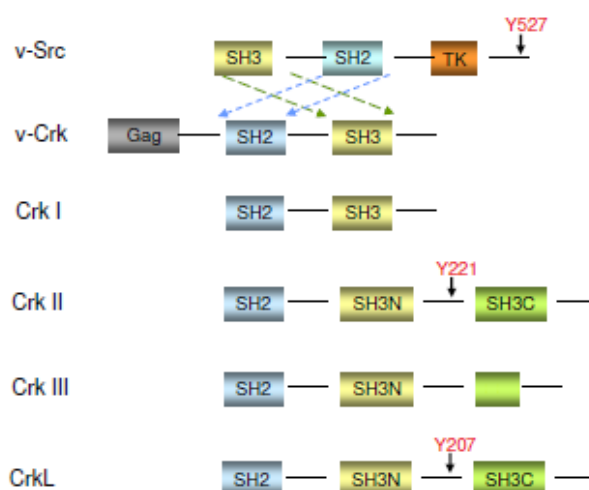
Před 27 lety byl Mayerem *et al.* (1988) identifikován onkogenní produkt ptačího retroviru CT10. Transformace buněk tímto virovým proteinem vede ke zvýšení celkové fosforylace tyrozínu v buňkách, odtud jeho pojmenování jako „CT10 regulator of kinase“ - Crk. Nedlouho poté byl tento onkogen objeven také v genomu ptačího retroviru ASV-1 (Tsuchie *et al.*, 1989). Sekvence *v-crck* obsahuje oblasti homologní s SH2 a SH3 doménou proteinu Src (Src homology 2,3), které se objevují u řady dalších proteinů, podílejících se na buněčné signalizaci. Překvapující byla v době objevení proteinu skutečnost, že nemá žádnou vlastní kinázovou aktivitu. Ukázalo se, že za transformační aktivitu *v-crck* jsou zodpovědné právě SH domény a že SH2 doména zprostředkovává vazbu na proteiny fosforylované na tyrozínech (Mayer and Hanafusa, 1990; Matsuda *et al.*, 1990; Matsuda *et al.*, 1991). Tato zjištění spolu se snahou o pochopení, jakým mechanismem *v-crck* ovlivňuje aktivitu tyrozínových kináz v buňkách, přispěla k osvětlení mechanismu přenosu signálu v buňkách na základě modulární stavby proteinů a jejich interakcí pomocí vazebných domén a k pochopení funkce adaptorových proteinů. Adaptorové proteiny, tedy proteiny obsahující výhradně vazebné domény, umožňují tvorbu proteinových komplexů, a tak se podílí na regulaci buněčné signalizace.

Nedlouho po popsání virového *v-Crk* byl objeven jeho buněčný homolog *c-Crk*, který se v buňkách vyskytuje ve dvou sestřihových variantách označených jako Crk-I (28 kDa) a Crk-II (42 kDa) (Matsuda *et al.*, 1992; Reichman *et al.*, 1992). Rodina Crk proteinů se brzy rozrostla o příbuzný protein CrkL (ten Hoeve *et al.*, 1993). Posledním identifikovaným členem rodiny je Crk-III, který vzniká alternativním sestřihem ze stejného genu jako Crk-I a Crk-II (Prosser *et al.*, 2003). Funkce Crk-III v buňce zatím nebyla podrobněji studována.

Intenzivní výzkum proteinu Crk v devadesátých letech se zaměřil především na identifikaci jeho SH3- a SH2-vazebných partnerů, což umožnilo upřesnit, na kterých signálních drahách se Crk podílí a jaká je jeho role v buněčné signalizaci. Další desetiletí výzkumu přinesla řadu svědectví o úloze proteinů Crk v nádorových onemocněních. V posledních letech je pozornost věnována hlavně roli jednotlivých izoform (především pak CrkL) v onkogenní signalizaci a také účasti Crk v nekanonických signálních drahách (viz kapitola 3.2.1.).

3.2. Struktura a funkce proteinu Crk

Crk patří spolu s proteiny Nck a Grb do skupiny adaptorových proteinů složených pouze z SH2 a SH3 domén. Crk-I, podobně jako v-Crk, obsahuje jednu SH2 doménu v N-terminální části a jednu SH3 doménu. Crk-II, Crk-III a CrkL mají navíc druhou, C-terminální SH3 doménu (SH3C; u Crk-III je zkrácená) a linker spojující obě SH3 domény (viz Obr. 3.1).

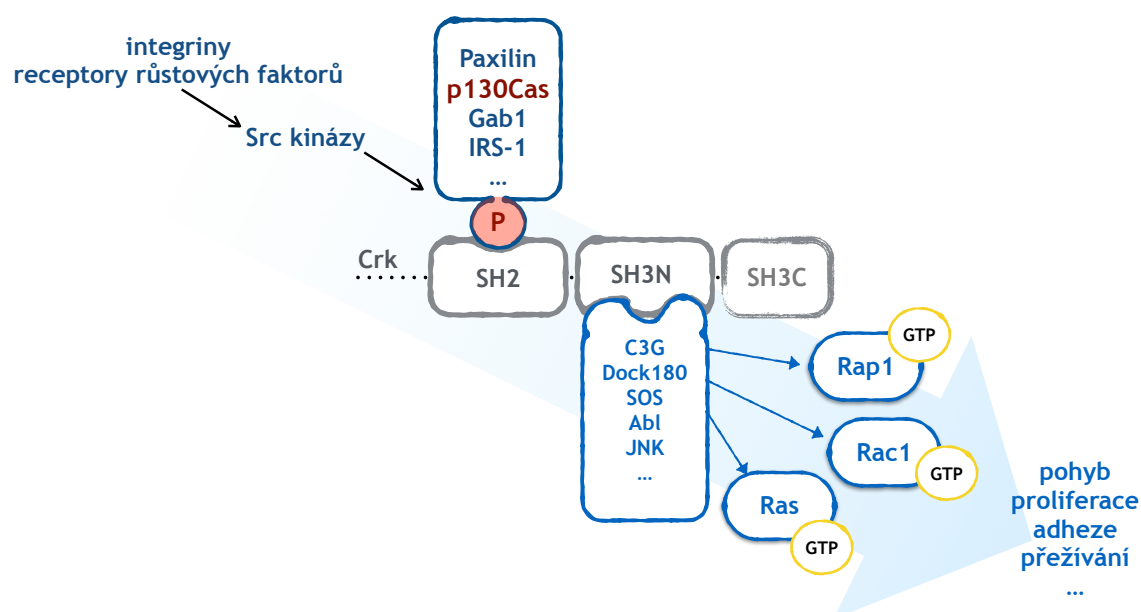


Obr. 3.1: Uspořádání SH2 a SH3 domén u jednotlivých členů rodiny Crk v porovnání s proteinem Src. Šipky naznačují regulační fosforylační místa Y221 u CrkII, Y207 u CrkL a Y527 u Src. TK je kinázová doména proteinu Src; Gag je specifický skupinový antigen kódovaný CT10 retrovirem. Převzato a upraveno dle Birge et al., 2009.

SH2 doména proteinu Crk rozpoznává proteiny fosforylované na tyrozínech (Matsuda et al., 1991), konkrétně pTyr-X-X-Pro motiv (Songyang et al., 1993). Váže proteiny fokálních adhezí p130Cas (Sakai et al., 1991) a paxilin (Birge et al., 1993), receptory růstových faktorů (shrnutí ve Feller et al., 1998) nebo protein Gab1 (Garcia-Guzman et al., 1999). K vazebným proteinům N-terminální domény (SH3N) patří především guanosin-nukleotid výměnné faktory (GEF) malých GTPáz rodiny Rho a Ras - proteiny Dock180, C3G a Sos (Knudsen et al., 1994; Matsuda et al., 1994; Hasegawa et al., 1996; Matsuda et al., 1996), dále pak kinázy Abl (Feller et al., 1994) a PI3K (Sattler et al., 1997). SH3C doména proteinů Crk-II a CrkL není klasickou SH3 doménou. V důsledku nahrazení aromatických aminokyselin konzervovaných ve vazebné oblasti kanonických SH3 domén aminokyselinami polárními není schopná

vázat SH3 doménami rozpoznávaný polyprolinový motiv (Reichman et al., 1992; Muralidharan et al., 2006).

Obr. 3.2 naznačuje, jak se protein Crk podílí na přenosu signálu v buňkách. Extracelulární stimuly aktivují integrinové receptory a receptory růstových faktorů, což vede k fosforylaci tyrozínů proteinů vázajících CrkSH2 a ty vytvoří komplex s proteinem Crk. Crk integruje signál přicházející od proteinů vázajících SH2 doménu a přes svoji SH3 doménu ho předává dále na proteiny vázající CrkSH3. Ty posléze aktivují malé GTPázy jako je Rac a Rap1, které se v konečném důsledku podílí na regulaci takových buněčných procesů, jako je pohyb, adheze, proliferace a přežívání, diferenciace nebo efferocytóza (shrnutí v Birge et al., 2009).



Obr. 3.2: Schematické znázornění přenosu signálu přes SH2 a SH3 doménu proteinu Crk. Modrá šipka naznačuje směr přenosu signálu, červené P značí fosfotyrozín.

V kontextu prostorové a časové lokalizace signálních molekul v buňkách daný model vypadá následovně: Crk se vyskytuje v cytoplazmě v komplexu s proteiny vázajícími SH3 doménu, aktivátory malých GTPáz (GEF). Proteiny vázající CrkSH2 jsou převážně lokalizovány submembránově (proteiny fokálních adhezí - p130Cas a paxillin) nebo přímo na membráně (receptory růstových faktorů). Fosforylace tyrozínů vazebných míst proteinů vázajících CrkSH2 v důsledku aktivace signální dráhy a interakce Crk

s proteiny vázajícími CrkSH2 tudíž vede k lokalizaci celého komplexu do blízkosti membrány. Tím se proteiny vázající CrkSH3 dostávají do blízkosti malých GTPáz, které jsou kotveny v membráně, a aktivují je tak, že katalyzují výměnu navázaného GDP za GTP. Aktivované GTPázy následně aktivují své efektory, mezi které patří například i stresové kinázy (Dolfi et al., 1998; Klemke et al., 1998; Cheresch et al., 1999 a další; shrnuto v Chodniewicz a Klemke, 2004; Birge et al., 2009).

Crk tvoří proteinové komplexy s různými proteiny a podílí se tak na celé řadě signálních drah indukovaných množstvím stimulů, včetně růstových faktorů a cytokinů, kontaktu se složkami extracelulární matrix, mechanického napětí, kontaktu s apoptotickými tělísky nebo patogeny. Výstupem signálních drah, ve kterých je Crk zapojen, je nejčastěji modulace aktomyosinového cytoskeletu a migrace buněk, proliferace, diferenciace či fagocytóza (shrnutí v Birge et al., 2009; Feller, 2001; Feller et al., 1998; Sattler a Salgia, 1998; roli Crk v interakci bakterií a hostitelských buněk shrnuje Martinez-Quilez et al., 2014; roli Crk v buňkách imunitního systému shrnuje Liu, 2014).

3.2.1. Regulace aktivity proteinu Crk a rozdíl v signalizaci jednotlivých izoform

Už Matsuda et al. (1992) poukázali na odlišnou biologickou aktivitu jednotlivých izoform Crk. Pozorovali, že ektopická exprese Crk-I (obdobně jako v-Crk) vede k transformaci fibroblastů, na rozdíl od Crk-II, který transformační aktivitu nevykazoval. Senechal et al. (1996) následně prokázali transformační aktivitu CrkL. Jednotlivé izoformy Crk vykazují i rozdílnou preferenci pro proteiny vázající CrkSH3N (Antoku a Mayer, 2009; Wang et al., 2011), s výjimkou sekvenčně velmi podobných Crk-II a CrkL, které mohou mít do jisté míry překrývající funkci (Park a Curran, 2014; Antoku a Mayer, 2009; Park et al., 2008).

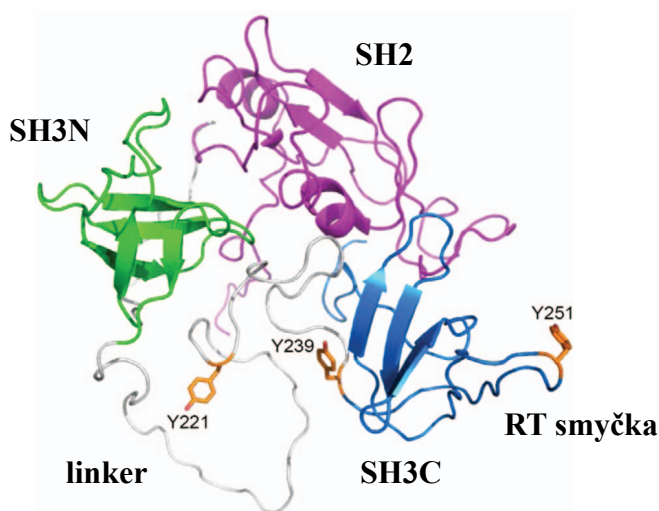
Regulace Crk fosforylací tyrozínu 221 kinázou Abl

Za odlišnosti v biologické aktivitě jednotlivých izoform Crk je primárně zodpovědná C-terminální oblast, kterou má Crk-II a CrkL navíc oproti v-Crk a Crk-I. Tato oblast představuje SH3C doménu a asi 50 aminokyselin dlouhý linker za SH3N

doménou. Jedním ze způsobů regulace Crk-II a CrkL je fosforylace kinázou Abl. Linker mezi SH3 doménami nese regulační fosforylační místo - tyrozín 221 (Y221, Crk-II), respektive tyrozín 207 (Y207, CrkL), který v závislosti na fosforylaci kinázou Abl vytváří vazebné místo pro vlastní SH2 doménu Crk proteinu (Feller et al., 1994; de Jong et al., 1997). Zatímco u Crk-II vede intermolekulární interakce pY221 a SH2 domény ke sbalení proteinu a zablokování přístupu interakčních partnerů k SH3N doméně, u CrkL dochází sbalením pouze k inhibici vazby proteinů vázajících SH2 doménu a SH3N doména zůstává přístupná vazbě (de Jong et al., 1997; Jankowski et al., 2012).

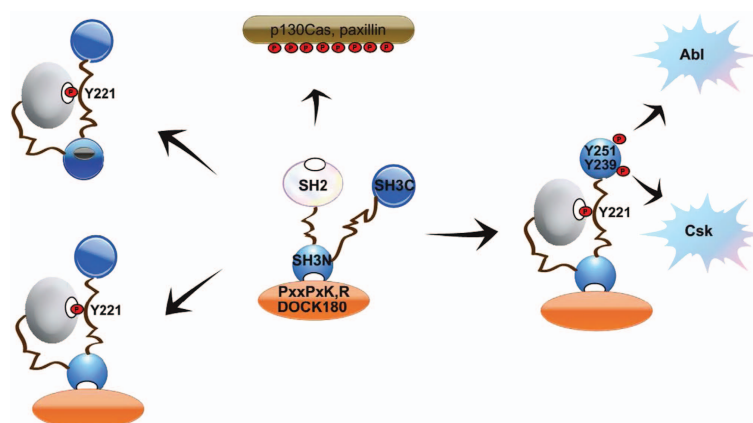
Regulační funkce C-terminální SH3 domény

Jak již bylo řečeno, atypická SH3C doména proteinů Crk-II a CrkL neváže polyprolinový vazebný motiv a nepodílí se tedy na kanonické signalizaci. Intenzivní výzkum této domény v posledních letech přinesl několik poznatků, které poukazují na důležitou roli SH3C v regulaci Crk signalizace. Na rozdíl od kanonických SH3 domén CrkSH3C má tyrozínový zbytek v oblasti RT smyčky (tyrozín 251), který může být fosforylován kinázou Abl, obdobně jako tyrozín 221 (viz Obr. 3.3). Fosforylací tyrozínu 251 (Y251) vzniká vazebný motiv pro SH2 a PTB domény jiných proteinů, přičemž například vazba SH2 domény kinázy Abl napomáhá rozbalení autoinhibované



Or. 3.3: Regulační fosforylační místa C-terminální oblasti proteinu Crk. Schema ukazuje strukturu proteinu Crk. SH2 doména je vyobrazena růžově, SH3N zeleně, linker šedivě a SH3C modře. Lokalizace regulačních tyrozínů je vyznačena oranžově: Y239 a Y251 na SH3C a Y221 v oblasti linkeru. (PDB ID: 2EYZ; obrázek byl převzat a upraven dle Sriram et al., 2014.)

kinázy a její transaktivaci (Sriram et al., 2011; shrnuto v Sriram a Birge, 2012). V loňském roce bylo identifikováno další fosforylační místo SH3C domény - tyrozín 239 (Y239). Sriram et al. (2014) zjistili, že různé extracelulární stimuly vedou k rozdílným vzorcům fosforylace C-terminální oblasti Crk-II. Například stimulace integrinové signalizace fibronektinem vede k současné fosforylaci Y221 a Y251, zatímco stimulace PDGF receptoru vede k fosforylaci Y221 a Y239. Dále zjistili, že SH3N doména u fosforylovaného proteinu není inhibovaná a identifikovali C-terminální Src kinázu (Csk) jako další ligand fosforylované SH3C. Fosforylace tyrozínových zbytků C-terminální oblasti může tedy přepínat signalizaci Crk-II z klasické kanonické SH2-SH3N osy na nekanonickou signalizaci zprostředkovanou SH3C doménou (viz *Obr. 3.4*). Objevení interakce Crk s Csk nastiňuje možnost, jak by Crk mohl ovlivňovat hladinu tyrozínové fosforylace v buňkách. Csk je negativním regulátorem Src kináz a jejím vyvázáním by tedy Crk mohl přispívat k aktivaci Src. Úplný seznam kináz zodpovědných za fosforylaci SH3C domény, stejně jako identifikace jejích ligandů a přítomnost odpovídajících fosforylačních míst u CrkL je nutné podrobit dalšímu výzkumu, který by osvětlil roli nekanonické signalizace v signálních drahách, kterých se Crk účastní.



Obr. 3.4: Regule Crk-II fosforylací v C terminální oblasti.

Uprostřed: Nefosforylovaný Crk s navázaným ligandem SH3N domény (Dock180), SH2 doména váže fosfotyrozínový motiv SH2 ligandů (p130Cas, paxillin). *Vlevo:* Fosforylace Y221 Abl kinázou vede ke sbalení proteinu a inhibici SH2 domény, vazebné místo SH3N může být také blokováno (*vlevo nahoře*). *Vpravo:* Současná fosforylace Y221 a Y251/Y239 vede k aktivaci nekanonické signální dráhy zprostředkované SH3C doménou. SH2 doména je blokována, SH3N doména váže své ligandy. S fosforylovanou SH3C interagují kinázy Abl a Csk. Převzato z Sriram et al., 2014.

Strukturní odlišnost Crk-II a CrkL

Přestože Crk-II a CrkL vykazují velkou míru sekvenční podobnosti (především v oblasti modulárních domén), analýza terciální struktury odhalila překvapivou odlišnost ve vzájemném uspořádání domén. U obou izoform SH3 domény a linker mezi nimi vzájemně interagují a protein zaujímá neaktivní sbalenou konformaci. V případě Crk-II ke stabilizaci sbaleného stavu výrazně přispívá C-terminální SH3 doména (SH3C). U CrkL se naopak SH3C interakcí neúčastní a je volně přístupná vazbě ligandu. Dalším rozdílem v architektuře domén je částečné zakrytí vazebného místa SH2 domény SH3N doménou u CrkL, zatímco u Crk-II je naopak maskováno vazebné místo SH3N domény (Kobashigawa et al., 2007; Jankowski et al., 2012; shrnuto v Kobashigawa a Inagaki, 2012). Tyto výsledky naznačují, že zatímco modulární domény určují specifitu vazby ligandů, linkery mezi doménami a od nich se odvíjející struktura celého proteinu může ovlivňovat afinitu domén k jejich jednotlivým vazebným partnerům a dále tak dynamicky ovlivňovat signalizaci (Sriram a Birge, 2012).

3.3. Protein Crk a nádorová onemocnění

Deregulace proteinu Crk byla sledována u řady nádorových onemocnění, a to především u málo diferenciovaných metastázujících nádorů pokročilých stádií. Posledních deset let výzkumu proteinu Crk přineslo řadu důkazů o důležité roli členů rodiny Crk v onkogenní signalizaci. Zvýšená hladina Crk byla pozorována u nádorů plic, tlustého střeva, prsu, prostaty, vaječníku, ústní sliznice, dále u glioblastomů, rhabdomyosarkomů a gastrických nádorů (Nishihara et al., 2002; Miller et al., 2003; Rodrigues et al., 2005; Takino et al., 2003; Wang et al., 2007; Feng et al., 2010; Dai et al., 2011; Yamada et al., 2011; Linhu et al., 2006; Natsume et al., 2012; Zhao et al., 2013; Wang et al., 2013a; Yao et al., 2014; Yeung et al., 2013; Cheng et al., 2015 a další; shrnuto v Sriram a Birge, 2010; Bell a Park, 2012; Fathers et al., 2012; roli CrkL v nádorových onemocněních shrnuje Guo et al., 2014). Deplece Crk v nádorových buňkách pomocí siRNA vede ke snížení invazivity, schopnosti růst nezávisle na podkladu i tvořit nádory *in vivo* (Fathers et al., 2012; Rodrigues et al., 2005; Yanagi et al., 2012; Zhao et al., 2013; Wang et al., 2007). Crk proteiny jsou také hlavním substrátem fosforylovaným onkogenním fúzním proteinem Bcr-Abl, který se nachází u více než 95% případu chronické myeloidní leukémie (CML), přičemž preferenčně je fosforylován CrkL (i v přítomnosti Crk-II). Pokles fosforylace CrkL se využívá jako prognostický marker při léčbě CML pomocí imatinibu (inhibitor Bcr-Abl kinázy, komerčně známý pod jménem Glivec; White et al., 2007).

3.3.1. miRNA-126 a regulace hladiny Crk

U Crk-II ani CrkL se neobjevují žádné opakující se mutace ani mutace v regulačních oblastech (Y221/Y207; Kumar et al., 2014). Jakým způsobem tedy může docházet k deregulaci Crk v nádorových tkáních? Nedávno bylo zjištěno, že u nádorů žaludku dochází k amplifikaci chromozomální oblasti nesoucí gen *CRKL* (Natsume et al., 2012). Důležitou roli v regulaci hladiny Crk však hraje především mikroRNA-126 (miR-126). Hladina miR-126 negativně koreluje s hladinou Crk a je signifikantně snižena u řady nádorů (Tavazoie et al., 2008; Crawford et al., 2008; Feng et al., 2010; Li et al., 2009 a další; shrnuto v Ebrahimi et al., 2014). U nádorů prsu bylo zjištěno, že exprese miR-126 je epigeneticky umlčena DNA-methylací *egfl7* genu, jehož sedmým intronem

je miR-126 kódována (Watanabe et al., 2012). Ektopická exprese miRNA-126 vede ke snížení hladiny proteinů Crk-II i CrkL a inhibuje invazivitu gastrických a plicních rakovinných buněk *in vitro* i *in vivo* (Feng et al., 2010; Wang et al., 2013b; Li et al., 2014; Liu et al., 2014; Crawford et al., 2008; Li et al., 2009). miR-126 tedy může tím, že posttranslačně reguluje hladinu Crk, fungovat jako nádorový supresor. Li et al. (2009) zjistili, že exprese miR-126 je v buňkách transformovaných Src inhibována, což vede ke zvýšení hladiny Crk. Onkogenní kináza Src tedy skrze miR-126 ovlivňuje expresi Crk. Tento fakt, spolu s předpokladem, že Crk může aktivovat Src skrze nekanonickou signalizaci zprostředkovanou SH3C doménou (viz kapitola 3.2.1.), vybízí k zajímavé představě existence pozitivní zpětné vazby mezi těmito dvěma onkogeny.

3.4. Role proteinu Crk v invazivitě nádorových buněk

Jak bylo naznačeno v předchozí kapitole, protein Crk je klíčový pro invazivitu nádorových buněk a tedy i pro jejich schopnost tvořit metastázy. Roli proteinů Crk v invazivitě a metastázování shrnuje nedávný přehledový článek Tsudy a Tanaky (2012). V následujících kapitolách si představíme několik mechanismů, kterými se Crk může podílet na zvýšeném invazivním potenciálu rakovinných buněk.

3.4.1. Signální komplex p130Cas/Crk - molekulární spínač migrace

K nejdůležitějším vazebným partnerům SH2 domény proteinu Crk patří adaptorový protein fokálních adhezí p130Cas. Tento protein se podílí na integrinové signalizaci, která je aktivována kontaktem se složkami extracelulární matrix. Aktivace integrinových receptorů vede k fosforylaci p130Cas kinázami rodiny Src. Fosforylací tyrozínů substrátové domény proteinu p130Cas vzniká 15 vazebných míst (pTyr-X-X-Pro) pro CrkSH2 doménu (Vuori et al., 1996). U rakovinných buněk pankreatu s vysoce invazivním potenciálem (FG-M linie) byla prokázána zvýšená fosforylace p130Cas na tyrozínech substrátové domény (Klemke et al., 1998). Fosforylace p130Cas indikuje migraci a schopnost buněk invadovat *in vivo* v závislosti na vzniku p130Cas/Crk komplexu, který proto označili jako „molekulární spínač migrace“. Tvorba p130Cas/Crk komplexu navíc potlačením apoptózy napomáhá přežívání invazivních buněk ve 3D kolagenu v nepřítomnosti růstových faktorů a cytokinů (Cho a Klemke, 2000). Esenciální roli tohoto komplexu pro migraci a invazivitu buněk následně potvrdila řada dalších studií (Cheresh et al., 1999; Honda et al., 1999; Cho a Klemke, 2002; Takino et al., 2003; Brábek et al., 2005; Smith et al., 2008; roli p130Cas/Crk v integrinové signalizaci shrnuje Chodniewicz a Klemke, 2004). Navíc buňky transformované kinázou Src obsahující mutantní variantu p130Cas, u které jsou tyrozíny substrátové domény nahrazeny nefosforylovatelným fenylalaninem, a tudíž nemůže docházet ke vzniku p130Cas/Crk komplexu (S15F linie), mají sníženou schopnost invadovat do Matrigelu i tvořit metastázy *in vivo* (Brábek et al., 2005).

p130Cas a antiestrogenová rezistence

Lidský ortolog p130Cas BCAR1 získal své jméno jako jeden z proteinů zodpovědných za získání antiestrogenové rezistence („breast cancer antiestrogen resistance 1“), která se vyvíjí ve více než 25% případech nádorů prsu léčených pomocí antiestrogenové terapie. Antiestrogeny, jako například tamoxifen, blokují signalizaci estrogenových receptorů (ER) u ER pozitivních buněk (ER+) a tím inhibují jejich proliferaci (shrnutí v Dorssers et al., 2001; Clarke et al., 2003). Nadprodukce BCAR1 u ER+ buněk odvozených od lidských nádorů prsu koreluje s jejich rezistencí k tamoxifenu (Brinkman et al., 2000). Tento efekt je závislý na substrátové doméně BCAR1, její fosforylaci kinázou Src (Cowell et al., 2006; Brinkman et al., 2010; Soni et al., 2009) a tedy patrně na tvorbě komplexu BCAR1/Crk, přestože experimenty testující přímo úlohu Crk v tomto procesu zatím prováděny nebyly.

3.4.2. Aktivace malých GTPáz Rac, Rap1 a RhoA

Jak bylo řečeno výše (viz kapitola 3.2.), interakcí CrkSH2 domény s jejím ligandem dochází k lokalizaci Crk spolu s navázaným SH3N ligandem do blízkosti membrány (v případě vzniku komplexu p130Cas/Crk konkrétně do fokálních adhezí). Zde se nachází malé G-proteiny, mezi nimi GTPázy rodiny Rho (Rho, Rac, CDC42), které hrají klíčovou roli v regulaci aktomyosinového cytoskeletu. GTPázy jsou aktivovány specifickými výměnnými faktory guaninových nukleotidů (GEF), k nimž patří i některé z ligandů CrkSH3 domény.

Protein Dock180 je atypický GEF, který ve spolupráci s proteiny rodiny ELMO aktivuje GTPázu Rac1 (Kiyokawa et al., 1998; Brugnera et al., 2002), která je klíčovým regulátorem buněčné migrace. Rac1 stimuluje polymeraci aktinu a tvorbu lamelopodií, mimo jiné například aktivací Wave/Arp2/3 nukleárního komplexu (shrnutí v Ridley, 2001). Řada studií prokázala, že aktivace Rac1 pomocí Dock180 je nezbytná pro p130Cas/Crk-indukovanou migraci a invazivitu nádorových buněk (Cho a Klemke, 2000; Smith et al., 2008; Wang et al., 2010; Feng et al., 2011). Deplece Crk pomocí RNA interference vede ke snížení Rac1 aktivace (Watanabe et al., 2006; Linghu et al., 2006). Dolfi et al. (1998) zjistili, že aktivace p130Cas/Crk/Dock180/Rac1 signální dráhy vede také k aktivaci JNK signalizace.

Další GEF, který patří k CrkSH3N ligandům, je C3G, aktivátor Rap1 (Gotoh et al., 1995). Rap1 je protein příbuzný Ras GTPáze a je důležitý pro regulaci adhezivitu buněk. Posern et al. (2000) zjistili, že narušení tvorby komplexu Crk/C3G vede ke snížení aktivity Rap1. Naopak kotransfekce Crk a C3G indukuje migraci buněk (Uemura et al., 1998). Barrett et al. (2014) ukázali, že aktivace Rap1 v závislosti na p130Cas je nezbytná pro PDGF-indukovanou invazivitu gliomových buněk. C3G/Rap1 signalizace také indukuje metastatický potenciál rakovinných buněk pankreatu a u rakovinných buněk vaječníku podporuje produkci metaloproteáz (Huang et al., 2012; Che et al., 2015).

Crk signalizace je spojována také s aktivací GTPázy RhoA (Tsuda et al., 2002; Tsuda et al., 2004; Altun-Gultekin et al., 1998; Lawrenson et al., 2002). RhoA spolu s kinázou ROCK hraje důležitou roli v regulaci aktomyosinového cytoskeletu (především při kontrakci buněk) a dynamiky fokálních adhezí a tak přispívá k invazivnímu charakteru buněk (shrnuje v Ridley, 2001). Jakým způsobem by Crk mohl aktivovat RhoA, nebylo zatím objasněno, nebyl identifikován žádný CrkSH3N vazebný protein s GEF aktivitou pro RhoA. Antoku a Mayer (2009) navrhli, že Crk by mohl aktivitu RhoA regulovat přes Rap1 a jeho efektorový protein ARAP3, který patří k regulátorům RhoA.

3.4.3. Další proteiny kooperující s Crk na indukcii invazivity

Matrixové metaloproteázy a degradace ECM invadujícími buňkami

Několik studií poukázalo na vliv Crk-závislé signalizace na produkci matrixových metaloproteáz (MMPs). Tyto enzymy jsou sekretovány buňkami a štěpí složky extracelulární matrix v jejich blízkosti, čímž napomáhají buňkám invadovat skrz tkáň. Produkce MMPs je zvýšená u buněk transformovaných v-Crk (Liu et al., 2000; Hasegawa et al., 2009), zatímco deplece Crk vede ke snížení jejich exprese (Garcia-Guzman et al., 1999; Lv et al., 2013). Crk aktivuje produkci MMPs zřejmě v závislosti na aktivaci JNK signalizace, která reguluje transkripční faktor AP-1, zodpovědný za aktivaci transkripce MMPs (Hasegawa et al., 2009). Che et al. (2015) zjistili, že ke zvýšení produkce MMPs je nezbytný také C3G.

p120 katenin a ztráta mezibuněčných spojů

Mortazavi et al. (2011) zjistili, že Crk negativně ovlivňuje expresi p120 kateninu, což je protein stabilizující mezibuněčné adhezivní spoje. Snížená exprese p120 kateninu tudíž přispívá k epiteliálně-mezenchymálnímu přechodu („epitelial-mesenchymal transition“, EMT), tedy uvolnění buňky z původní tkáně a získání invazivního potenciálu.

Kináza Abl a regulace apoptózy u invadujících buněk

Důležitým předpokladem invazivního charakteru buňky je její schopnost přežívat v prostředí, kterým invaduje; tedy schopnost potlačit apoptózu vyvolanou nedostatkem specifických růstových stimulů a kontaktů v prostředí pro buňku nepůvodním. Kain et al. (2003) poukázali na roli fosforylace Crk na Y221 při přežívání invadujících buněk. U netransformovaných buněk se během invaze do kolagenu spouští apoptóza a v této fázi u nich byla pozorována zvýšená fosforylace Y221, a tedy inhibice tvorby p130Cas/Crk komplexu zprostředkovaná kinázou Abl (viz kapitola 3.2.1.). Naopak u vysoce invazivních pankreatických buněk linie FG-M je hladina fosforylace Y221 snížena a buňky v kolagenu přežívají, apoptóza se nespouští. Tyto výsledky poukazují na roli p130Cas/Crk signalizace a její regulace kinázou Abl při přežívání invadujících buněk, ke kterému může přispívat aktivace p130Cas/Crk/Dock180/Rac1 signalizace.

Regulace Crk fosforylací Y221 kinázou Abl je důležitá také pro správnou dynamiku fokálních adhezí, která je nutným předpokladem buněčné migrace. U buněk exprimujících nefosforylovatelný mutantní Crk-II je rozkládání fokálních adhezí výrazně zpomalené (Antoku a Mayer, 2009).

Interakce CrkL s prokaspázou 8

Nedávná publikace Grafa et al. (2012) označila prokaspázu 8 jako ligand CrkSH2 domény. Prokaspáza 8 je katalyticky neaktivním prekurzorem kaspázy 8, která je známá především pro svoji roli v iniciaci apoptózy vyvolané vnějšími faktory. Nicméně kaspáza 8 je spojována také se zvýšenou migrací a metastatickým potenciálem nádorových buněk, u kterých nedochází k apoptóze. Efekt kaspázy 8 na migraci buněk není závislý na její katalytické aktivitě, ale na její translokaci do periferních oblastí

buňky (shrnutí v Graf et al., 2014). V závislosti na aktivaci integrinové signalizace dochází k fosforylaci katalytické domény prokaspázy 8 kinázou Src a její interakci s SH2 doménou proteinu CrkL (ale nikoliv Crk). CrkL je nezbytný pro translokaci prokaspázy 8 do oblasti fokálních adhezí a pro zprostředkování kaspázou indukované migrace buněk. Exprese CrkL v buňkách exprimujících kaspázu 8 navíc indukovala na podkladu nezávislý růst buněk a přežívání buněk v 3D kolagenu (Graf et al., 2012).

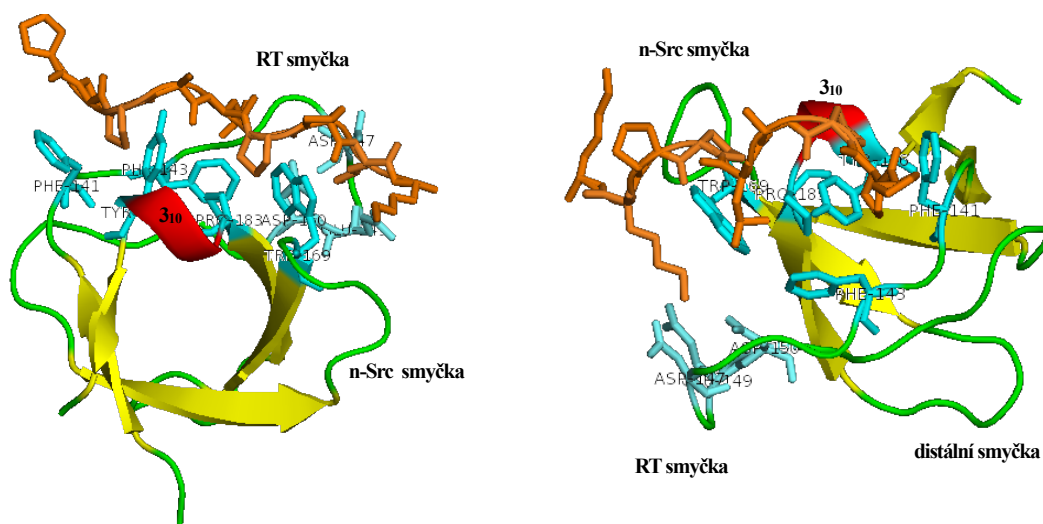
3.5. Protein Crk jako možný cíl terapeutické strategie

Pro svoji centrální úlohu v buněčné signalizaci a význam v nádorových onemocněních je adaptorový protein Crk často označován jako vhodný cíl protirakovinné terapeutické strategie (shrnutí ve Feller a Lewitzky, 2006). Signalizace adaptorových proteinů může být blokována pomocí peptidů či jejich derivátů, které se kompetitivně váží na jejich vazebné domény a zabraňují tak interakci s jejich přirozenými ligandy. Myšlenka cílit SH domény pomocí specifických nízkomolekulárních inhibitorů se zrodila záhy po pochopení jejich funkce v signalizaci (shrnutí v Smithgall, 1995; Dalgarno et al., 1997; Vidal et al., 2001). Problém v této strategii ovšem představuje velké množství SH domén, které se vyskytuje v buňkách (databáze SMART¹ aktuálně vyhledá přes 300 SH2 domén a 950 SH3 domén v lidském genomu), což klade požadavek na vysokou selektivitu jejich inhibitorů. Polyprolinové peptidy, které jsou rozpoznávány SH3 doménami, se navíc typicky vážou s poměrně nízkou afinitou (K_D se obvykle pohybuje v rozmezí 5-100 μM) i selektivitou, proto design vhodného inhibitoru často vyžaduje modifikace zvyšující afinitu a selektivitu vazby.

3.5.1. Struktura SH3 domény a její vazebný motiv

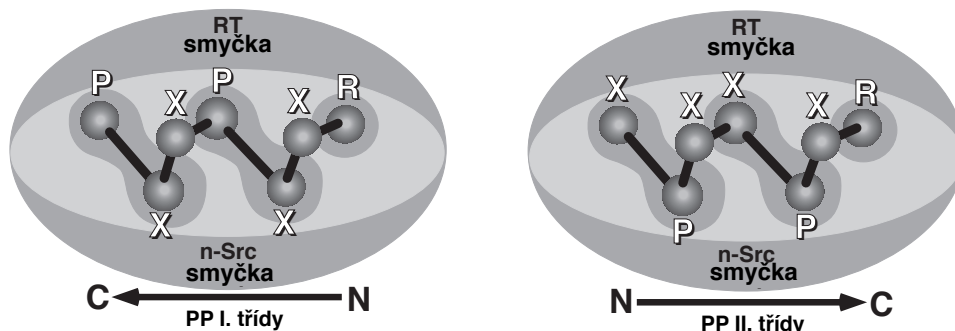
SH3 domény jsou vysoce konzervované u různých proteinů napříč mnohobuněčnými organismy. Zaujímají strukturu β -barelu složeného z pěti β -řetězců (viz *Obr. 3.5*). Ty jsou uspořádány do dvou β -listů, menšího βI a většího βII , které mezi sebou svírají úhel přibližně 90°. β -řetězce SH3 domény jsou odděleny třemi smyčkami (RT smyčka, N-Src smyčka a distální smyčka) a krátkým 3_{10} helixem. N- i C-konec domény jsou blízko u sebe, na opačné straně, než je vazebné místo. To je tvořeno konzervovanými aromatickými aminokyselinami, které vytváří dvě kapsy, do kterých se váže jádro vazebného motivu ligandu. Ligandem je na prolin bohatý peptid, zaujímající konformaci polyprolinového helixu. Podle orientace polyprolinového helixu na SH3 doméně rozdělujeme ligandy na polyprolinové helixy třídy I. a II. (PPI/II). Jádro vazebného motivu tvoří P-x-x-P sekvenec. V její blízkosti se vyskytuje bazická

¹<http://smart.embl-heidelberg.de>



Obr. 3.5: Struktura CrkSH3N domény v komplexu s vazebným peptidem odvozeným od C3G. Oranžově je vyznačen vazebný peptid, modře aminokyseliny tvořící vazebné kapsy SH3 domény. β -řetězce jsou znázorněny žlutě, smyčky zeleně, 3_{10} helix červeně. (PDB kód 1CKA, Wu et al., 1995.) Zobrazeno v programu PyMOL 1.3 (DeLano; 2009).

aminokyselina (arginin nebo lysin), buď na N- nebo C-konci vazebného motivu, podle toho, do které třídy helix spadá (PPI, od N-konce: R/K-x-x-P-x-x-P; PPII: P-x-x-P-x-R/K). Pozice bazické kyseliny určuje orientaci, ve které se helix na SH3 doménu váže (viz Obr. 3.6). CrkSH3N doména rozeznává výhradně PPII helixy. Každou obrátku PPII helixu tvoří tři aminokyselinové zbytky, z čehož vyplývá, že pyrrolidinové kruhy prolinů P-x-x-P motivu jsou na stejné straně helixu. To umožňuje jejich patrové („stacking“) interakce s aromatickými aminokyselinami, které tvoří vazebné kapsy SH3 domény (shrnutí v Musacchio, 2002). Zmiňovaná bazická aminokyselina se váže do třetí kapsy, kterou mezi sebou vytváří RT a N-Src smyčky. Primární struktura smyček není konzervovaná, u jednotlivých proteinů se liší, a proto je třetí kapsa zodpovědná za specifitu vazby. SH3 domény mají odlišnou preferenci pro první bazickou aminokyselinu, která následuje P-x-x-P motiv. CrkSH3N váže PPII s lysinem (P-x-x-P-x-K) s výrazně vyšší afinitou, než PPII s argininem v téže pozici (Knudsen et al., 1995). Specifitu vazby mohou dále ovlivňovat aminokyseliny, které rámuji vazebný motiv (shrnutí v Saksela a Permi, 2012).



Obr. 3.6: Vazba PPI a PPII ligandů na SH3 doménu. Obrázek znázorňuje schematicky SH3 doménu a vyznačuje orientaci, ve které se na SH3 váží polyprolinové helixy I. (vlevo), respektive II. (vpravo) třídy. PPI ligandy obsahují kotvící arginin na svém N-konci, zatímco u PPII je arginin na C-konci. Převzato z Mayer et al., 2001.

3.5.2. Od vazebného motivu k vysokoafinním ligandům - cesta k nalezení ideálního inhibitoru CrkSH3N domény

K identifikaci vazebného motivu N-terminální SH3 domény proteinu Crk přispěla analýza jejího ligandu C3G. V sekvenci C3G byly identifikovány čtyři na prolin bohaté oblasti, které jsou zodpovědné za vazbu CrkSH3N domény (tzv. CB1-4 sekvence - „Crk binding 1-4“). C3G váže CrkSH3N doménu s větší specifitou než její ostatní ligandy (Knudsen et al., 1994). Mutační analýza CB1 peptidu odhalila, že pro specifitu vazby je klíčová přítomnost lysinu, jak již bylo zmíněno výše. Afinita vazby CB1 peptidu (PPPALPPKKR) je na poměry SH3 domén poměrně vysoká ($K_D = 1,9 \mu\text{M}$). Peptid odvozený od vazebné sekvence dalšího ligandu CrkSH3N, proteinu Sos, který v dané pozici obsahuje místo lysinu arginin, váže CrkSH3N s nižší afinitou ($K_D = 5,2 \mu\text{M}$) a zároveň váže s podobnou afinitou i SH3 doménu adaptorového proteinu Grb2, zatímco afinita CB peptidu k SH3 doméně Grb2 je výrazně nižší ($K_D = 142 \mu\text{M}$; Knudsen et al., 1995). CrkSH3N doménou preferovaný vazebný motiv P-x-x-P-x-K byl potvrzen i analýzou *phage display* (Sparks et al., 1996).

Tyto poznatky byly využity v další snaze o vyvinutí inhibitoru schopného blokovat signalizaci CrkSH3 domény. Postup vývoje inhibitorů zlepšováním vazebných vlastností endogenních buněčných sekvencí má tu výhodu (narozdíl od *de novo*

navržených sekvencí), že minimalizuje riziko případné cytotoxicity (Posern et al., 1998).

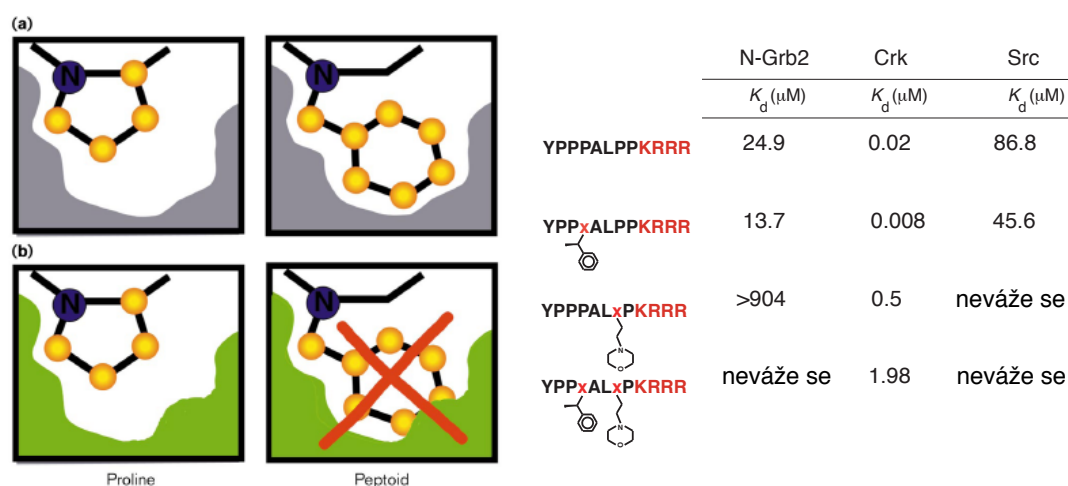
HACBPs

Mutageneze CB-1 peptidu vedla k vývoji krátkých peptidů vázajících s vysokou afinitou CrkSH3N doménu - *HACBPs* („**H**igh **A**ffinity **C**rk **B**inding **P**eptides“; Posern et al., 1998). Disociační konstanta (K_D) peptidu s nejlepší dosaženou afinitou (PPPALPPKRR) byla 0,361 μ M. Selektivita vazby HACBPs byla ověřena metodou Far Western a precipitací SH3 domén pomocí biotinylovaných *HACBPs*. Z asi 30 testovaných buněčných SH3 domén *HACBPs* vykazovaly vazbu pouze k SH3N doménám Crk-I/II a CrkL. *HACBPs* byly také schopné rozrušit CrkSH3/Dock180 a CrkSH3/C3G komplex *in vitro*.

Vylepšení selektivity a afinity vazby peptoidovou modifikací

Způsob, jak dále vylepšit afinitu a selektivitu vazebných peptidů, představili Nguyen et al. (2000). Peptidy odvozené od známých buněčných ligandů SH3 domén modifikovali nahrazením jednoho z prolinů vazebného motivu různými N-substituenty (peptoidy). Tato strategie vychází ze skutečnosti, že SH3 doména rozpoznává N-substituci peptidové kostry; z endogenních aminokyselin tuto podmínku splňuje pouze prolin. Ten ale může být uměle nahrazen jiným N-substituentem, který bude také rozpoznáván SH3 doménou (Nguyen et al., 1998). Navíc může být komplementarita substituentu a vazebného povrchu lepší než u prolinu a substituce tak může pozitivně ovlivnit afinitu. Vazebné povrchy jednotlivých SH3 domén mohou vykazovat drobné odchylky, které nejsou rozpoznávány prolinem, ale substituenty je mohou odlišit - tím se docílí zvýšení selektivity vazby ligandu (viz *Obr. 3.7*). Různou kombinací těchto substitucí lze tedy teoreticky získat hybridní peptido-peptoidový ligand, který selektivně váže jedinou SH3 doménu. Nguyen et al. připravili několik peptoidů kombinací různých substitucí a vazebných sekvencí a pro ilustraci testovali jejich afinitu ke třem různým SH3 doménám: SrcSH3, Grb2SH3 a CrkSH3N. CrkSH3N ligand vychází z dříve publikované sekvence vysokoafinního *HACBP* (YPPPALPPKRR). Nahrazením prvního prolinu P-x-x-P motivu N-(S)-fenylethylem byl získán ligand vázající

CrkSH3N s $K_D = 0,008 \mu\text{M}$, což je doposud nejpevnější pozorovaná interakce SH3 domény. Afinita tohoto ligandu k ostatním dvěma testovaným doménám byla mnohem nižší, což poukazuje na vysokou selektivitu tohoto peptoidu (v rámci testovaného setu SH3 domén). Pomocí dalších modifikací lze docílit dalšího vylepšení selektivity, ale za cenu snížení afinity k CrkSH3N (viz Obr. 3.7).



Obr. 3.7: Mechanismus zvýšení selektivity vazby pomocí peptoidové substituce. Na obrázku vidíme vazebný povrch dvou různých SH3 domén: (a) - šedě, (b) - zeleně. Zatímco prolin je rozeznáván oběma doménami (vlevo), peptoid je komplementární pouze s vazebným povrchem domény (a) (vpravo). Tabulka vpravo ukazuje, jak je vylepšena afinita ligandu pomocí N-(S)-fenylethylu. (Převzato a upraveno dle Nguyen et al., 2000.)

3.5.3. Inhibice signalizace proteinu Crk cílením SH3N domény

Doposud bylo publikováno jen několik prací, jejichž cílem bylo zablokovat přenos signálu proteinu Crk pomocí inhibice CrkSH3N domény. Posern et al. (2000) analyzovali vliv Crk/C3G komplexu na bombesinem stimulovanou aktivaci Rap1 GTPázy. K zablokování tvorby Crk/C3G komplexu připravili CBR konstrukt odvozený od CrkSH3N vazebného motivu C3G, kterým transfekovali 3T3 buňky. CBR konstrukt byl schopný narušit tvorbu Crk/C3G komplexu, což vedlo ke snížení aktivace Rap1 v transfekovaných buňkách.

Kardinal et al. (2000) se zaměřili na interakci SH3N domény proteinu CrkL a onkogenního fúzního proteinu Bcr-Abl v nádorových buňkách pacientů s chronickou myeloidní leukémií (CML). K narušení interakce těchto dvou proteinů využili *HACBP*s

peptidy. *HACBPs* vedly ke snížení aktivace MAPK kináz a inhibovaly proliferaci nádorových buněk. Obdobný efekt má i inhibice adaptorového proteinu Grb2, který se účastní mitogenní dráhy Grb2-Sos-Ras-Erk, pomocí specifických *HAGBPs* peptidů („**H**igh **A**ffinity **G**rb2 **B**inding **P**eptides“; Kardinal et al., 2001).

Jiný přístup k inhibici signalizace Crk proteinu zvolili Pezeshkpour et al. (2013). Namísto kompetitivního ligandu použili exogenní CrkSH3N doménu, kterou transfekovali buňky odvozené od nemalobuněčných nádorů plic. Tato samostatná doména má v buňkách vyvazovat interakční partnery CrkSH3N domény (jako je C3G nebo Dock180) a tak přerušit přenos signálu z Crk proteinu. Exprese CrkSH3N vedla ke snížení tvorby komplexu Crk-II/Dock180 a ke snížení migrace a invazivity buněk.

Tyto výsledky ukazují, že inhibice tvorby komplexů N-terminální domény proteinu Crk by mohla být vhodnou strategií protinádorové a protimetastatické terapie.

4. MATERIÁL

4.1. Organizmy

4.1.1. Bakterie

Escherichia coli K12 **DH5α**: *relA1 recA gyrA96 deoR thi-1 supE44*
φ80dlacZΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(r_K⁻, m_K⁺)

Escherichia coli **BL21**: F⁻ *ompT hsdS*(r_B⁻, m_B⁻), λDE3, lysogen

4.1.2. Savčí buněčné linie

SC: Cas ^{-/-} myší embryonální fibroblasty retrovirálně transfekované a selektované na konstrukty, které nesou geny pro Src 527F a WT Cas (Brábek et al., 2004)

S15F: Cas ^{-/-} myší embryonální fibroblasty retrovirálně transfekované a selektované na konstrukty, které nesou geny pro Src 527F a mutantní 15F variantu Cas (všech 15 tyrosinů v substrátové doméně nahrazeno fenylalaninem; Brábek et al., 2005)

MDA-MB 231: lidské buňky odvozené od nádoru prsu

4.2. Kultivační média

4.2.1. Média pro kultivaci bakterií

Pro přípravu médií používáme „milíporovanou“ vodu; média sterilizujeme v autoklávu při 121 °C (20 min).

1xLB	10 g/l Universal pepton M66 (MERCK, Německo)
	5 g/l Yeast Extract (OXOID, UK)
	5 g/l NaCl

plotny s živným agarem	10 g/l Universal pepton (MERCK, Německo)
	5 g/l Yeast Extract (OXOID, UK)
	5 g/l NaCl
	15 g/l bactoagar

selekční antibiotika 100 mg/ml Ampicilin (Biotika, SR)

- zásobní roztok 1000x, skladujeme v -20 °C; do média přidáváme po klávení
a zchlazení na cca 50 °C

20% glukóza

60% glycerol (Sigma, USA)

4.2.2. Média pro kultivaci savčích buněčných linií

kompletní médium DMEM

DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; Gibco, Invitrogen)

10% fetální bovinní sérum (FBS; Sigma, USA)

0,5% neesenciální aminokyseliny (Gibco, Invitrogen)

0,5% všeobecná antibiotika - antimykotika (10 mg/ml penicilin, 10 mg/ml streptomycin, 25 µg/ml amphotericin; Gibco, Invitrogen)

další roztoky užívané při kultivaci savčích buněk:

0,25% Trypsin-EDTA (2,5 g/l trypsin, 0,38 g/l EDTA; Gibco, Invitrogen)

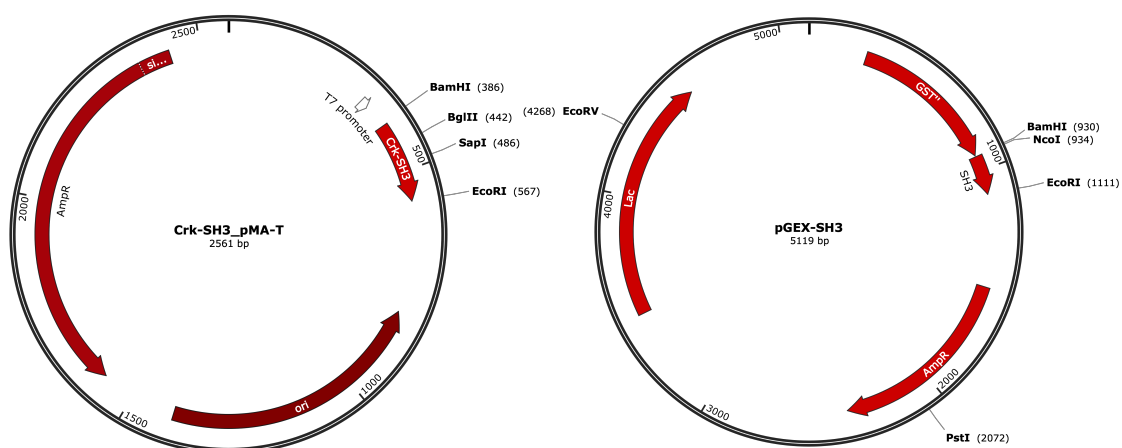
zamrazovací roztok 10% dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, USA)

90% FBS (Sigma, USA)

4.3. Materiál pro práci s DNA

4.3.1. Plazmidy

Crk-SH3_pMA-T (Life Technologies): plazmid nesoucí N-terminální SH3 doménu proteinu Crk.



pGEX-SH3: plazmid pro bakteriální expresi GST-fúzních SH3 domén proteinů Crk a Src připraven na základě **pGEX2T** (Amersham); sekvence kódující SH3 doménu do vektoru vložena přes restrikční místa EcoRI a BamHI.

4.3.2. Izolace plazmidové DNA

NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel, Německo)

alkalická izolace:

roztok I (TEG):	25 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	10 mM EDTA - NaOH
	1% glukóza
roztok II (SDS):	1% SDS
	0,2 M NaOH
roztok III (KAc):	3 M octan draselný
	2 M kyselina octová
	pH 5,4
	10 M LiCl, 96% ethanol, izopropanol

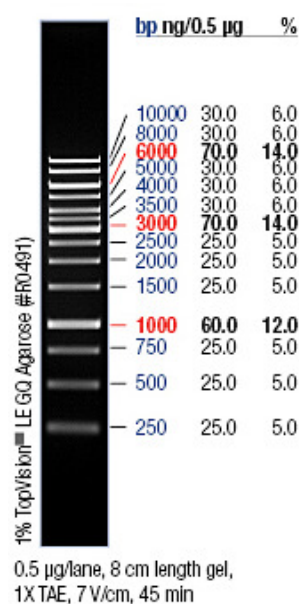
4.3.3. Agarózová elektroforéza

agaróza (1:1 NuSieve a See Kem; FMC, USA)

DNA G Stain (Serva, Německo)

standard molekulové hmotnosti

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Mix
(Thermo Scientific, USA)



TAE pufr 40 mM Tris (pH 8,5)
 20 mM ledová kyselina octová
 2 mM Na₂EDTA

10x nanášecí pufr (NEB, USA)

NucleoSpin® Extract (Macherey-Nagel, Německo)

4.3.4. Štěpení a ligace

restrikční enzymy **BamHI-HF**, **EcoRI-HF** (NEB, USA)
 restrikční pufr **CutSmart** (NEB, USA)
T4 DNA ligasa (ThermoScientific, USA)

4.4. Materiál pro práci s proteiny

4.4.1. Purifikace proteinů, vazebné analýzy

Roztoky sterilizujeme v autoklávu při 121 °C po dobu 20 min.

LB1 pufr 50 mM HEPES, pH 7,4 (upraveno pomocí NaOH)
 100 mM NaCl

LB2 pufr 5 mM HEPES, pH 7,4 (upraveno pomocí NaOH)
 10 mM NaCl

1 M IPTG 1000x zásobní roztok v dH₂O, sterilizace filtrací

inhibitory proteáz cOmplete Mini EDTA-free (Roche, Švýcarsko)

TritonX-100 20% roztok v LB1 pufru

Glutathione Sepharose™ 4B (50% směs v 20% ethanolu;
 GE Healthcare, UK)

uvolňovací pufr 50 mM Tris; pH 8,0
 10 mM GSH
 1 mM DTT

GSH a DTT přidáváme vždy čerstvé do vyklávaného Tris

TBS pufr 50 mM Tris-HCl; pH 7,4
 150 mM NaCl

TTBS pufr 1x TBS
0,1-0,5% Tween 20

blokovací pufr ELISA 5 mg/ml BSA v 1x TBS

4.4.2. Materiál pro přípravu lyzátů a mikroskopických preparátů

lyzační pufr RIPA 0,15 M NaCl
50 mM Tris-HCl; pH 7,4
1% Nonidet P-40
0,1% SDS
1% deoxycholát sodný
5 mM EDTA
50 mM NaF

inhibitory proteáz MixM (0,5 mg/ml Aprotinin, 0,5 mg/ml Leupeptin,
12,5 mg/ml Pefabloc; ředění 100x; Serva, Německo)

inhibitory fosfatáz (Serva, Německo)

kit na určení proteinové koncentrace: **DC™ Protein Assay** (Bio-Rad, USA)

10x PBS 137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O
1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,3

10 µg/ml Fibronectin; zásobní roztok 1 mg/ml (Serva, Německo)

PFA 50 mM HEPES pufr; pH 7,4
8% paraformaldehyd
- ředíme pomocí 1xPBS na 4% paraformaldehyd

Alexa Fluor 488 Phalloidin (Invitrogen, USA)

montovací médium 12 ml pufru (60 mM PIPES, 25 mM HEPES,
1mM MgCl₂, 10 mM EGTA; pH 7,4)
6 ml dH₂O
6g glycerol
2,4 g mowiol

4.4.3. Materiál pro SDS-PAGE elektroforézu a Western blot

4xTris/SDS pH 8,8 1,5 M Tris-HCl; pH 8,8
0,4% SDS

4xTris/SDS pH 6,8 1,5 M Tris-HCl; pH 6,8
0,4% SDS

protogel 30% akrylamid
0,8% N,N'-methylenbisakrylamid

4xTris/SDS pufrý a protogel sterilizujeme filtrací, skladujeme při 4 °C, ve tmě.

TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin; Serva, Německo)

10% APS (amonium persulfát $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$; Sigma, USA)

SDS-PAGE pufr 25 mM Tris; pH 8,3
190 mM glycin
0,1% SDS

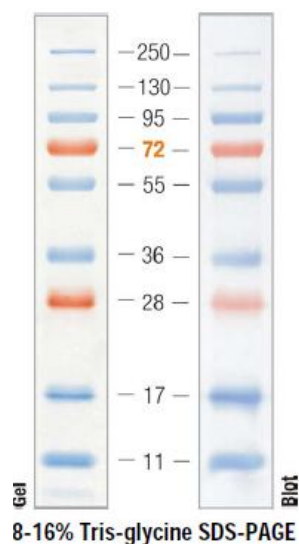
6xLaemmli pufr 0,35 M Tris-HCl; pH 6,8
40% glycerol
10% SDS
0,012% bromfenolová modř

DTT 1 M dithiothreitol; ředíme 1:20 - 1:100

standard molekulové hmotnosti proteinů

PageRuler Prestained Protein Ladder

(Thermo Scientific, USA)



CBB barvící roztok	20% methanol 10% kyselina octová 0,114% Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio Rad, USA)
odbarvovací roztok	20% methanol 7% kyselina octová

nitrocelulózová membrána Amersham Hybond ECL (GE Healthcare, UK)

transferový pufr	25 mM Tris 192 mM glycín 20% methanol 0,05% SDS
-------------------------	--

Ponceau S	0,1% Ponceau 5% kyselina octová
------------------	------------------------------------

blokovací roztok	4% BSA (Sigma, USA) v TBS
-------------------------	---------------------------

primární protilátky:

pY861 FAK (monoklonální králičí; Cell Signaling)

FAK (c-20) (polyklonální králičí; Santa Cruz Biotechnology)

aktin (polyklonální kozí; Santa Cruz Biotechnology)

sekundární protilátky:

GAR-HRP (polyklonální kozí; PIERCE)

DAG-HRP (polyklonální oslí; Santa Cruz Biotechnology)

kit **Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate** (roztok luminolu s enhancerem, roztok stabilního peroxidu; Pierce Biotechnology, USA)

4.4.4. Materiál používaný při buněčných analýzách

invazivita ve 3D kolagenu

kolagen R (krysí, typ I; 4mg/ml; Serva, Německo)

NaHCO₃ (Sigma, USA)

10x HMEM

10x PBS (Invitrogen)

1M NaOH (Sigma, USA)

test schopnosti růst nezávisle na podkladu

2x DMEM 10 ml 10x DMEM (Sigma, USA)
10 ml FBS (Sigma, USA)
1 ml 7,5% NaHCO₃ (Sigma, USA)
1 ml neesenciální aminokyseliny (Gibco)
1 ml antibiotika/antimykotika (Gibco)
27 ml klávovaná miliporová voda

Agar Noble (Sigma, USA)

test cytotoxicity

alamarBlue® (Invitrogen, USA)

zymografie

gelatin (Sigma, Německo)

renaturační pufr 50 mM TrisHCl; pH7,5
0,1 M NaCl
2,5% Triton X-100

aktivační pufr 50 mM Tris; pH 7,5
10 mM CaCl₂
0,02% azid sodný

4.4.5. Inhibitor CrkSH3N domény

Inhibitor rozpouštíme v H₂O pro tkáňové kultury (Sigma, USA). Zásobní roztok i nerozpouštěný inhibitor uchováváme při -80 °C.

CrkI N-(S)-fenylethyl substituovaný peptoid 23 (Nguyen et al., 2000),

M_w = 1510 g/mol



CrkFI fluorescenčně značený CrkI pomocí fluorescenční barvy 5-TAMRA,
Mw = 1922 g/mol

Inhibitory byly připraveny v laboratoři Mgr. Petra Cíglera, Ph.D. (Ústav organické chemie a biochemie AVČR).

5. METODY

5.1. Molekulární klonování

5.1.1. Izolace plazmidové DNA

NucleoSpin® Plasmid kit

- První den zaočkujeme bakteriemi nesoucími požadovaný vektor 1-3 ml LB média s ampicilinem (100 µg/ml) a necháme kulturu narůst přes noc (cca 16 hodin) při teplotě 37 °C za stálého třepání na třepačce (180 rpm).
- Druhý den ráno převedeme bakteriální kulturu do 1,5ml mikrozkušavky a centrifugujeme (30 s, 11 000 g). Supernatant odstraníme.
- Sediment resuspendujeme v 250 µl roztoku A1, přidáme 250 µl roztoku A2 a jemně promísíme. Inkubujeme při pokojové teplotě dokud z roztoku nevypadne bílá sraženina (maximálně po dobu 5 minut). Přidáme 300 µl roztoku A3, jemně promísíme a centrifugujeme (10 min, 11 000 g).
- Supernatant převedeme na NucleoSpin® Plasmid kolonku umístěnou v čisté sběrné mikrozkušavce a centrifugujeme (1 min, 11 000 g). Tekutinu ze sběrné mikrozkušavky odstraníme.
- Za účelem odstranění buněčných nukleáz můžeme na kolonku nanést 500 µl roztoku AW předehřátého na 50 °C a centrifugovat (1 min, 11 000 g).
Tento krok je vhodné zahrnout při práci s bakteriemi kmene BL21.
- Promyjeme kolonku 600 µl roztoku A4 (1 min, 11 000 g) a osušíme kolonku další centrifugací (2 min, 11 000 g).
- Kolonku přemístíme do nové 1,5 ml mikrozkušavky a nanese 25 - 50 µl elučního roztoku AE nebo deionizované vody. Po 1min inkubaci při pokojové teplotě centrifugujeme (1 min, 11 000 g).

Alkalická metoda

Materiál: LB médium; ampicilin; roztok I, II, III; izopropanol; 10M LiCl; 96% ethanol, 70% ethanol; deionizovaná voda

- První den zaočkujeme bakteriemi nesoucími požadovaný vektor 10 - 50 ml LB média s ampicilinem (100 µg/ml). Kultivujeme přes noc (cca 16 hodin) při teplotě 37 °C za stálého třepání na třepáčce (180 rpm).
- Druhý den kulturu ochladíme na ledové lázni, přelijeme do 50ml centrifugační zkumavky a centrifugujeme (3 000 g, 20 min, 0 °C).
- Sediment resuspendujeme v X ml roztoku I (TEG) a inkubujeme 30 minut na ledu. Objem X zvolíme podle výchozího množství kultury a jejího nárustu: 1 ml při izolaci z 10 ml kultury, 2-4 ml při izolaci z 50 ml.
- Zkumavku vyjmeme z ledové lázně a lyzujeme buňky přidáním 2X ml roztoku II (SDS). Jemně promícháme a inkubujeme po dobu 1-5 min.
- Zkumavku umístíme na ledovou lázeň a přidáme 1,5X ml roztoku III (KAc). Jemně promícháme a inkubujeme na ledu po dobu 30 - 60 min (dokud z roztoku nevypadne bílá sraženina).
- Směs převedeme do 15ml centrifugačních zkumavek a centrifugujeme (14 000 g, 20 min, 0 °C).
- Supernatant převedeme do nové 15ml centrifugační zkumavky, přidáme 0,6 objemu izopropanolu, dokonale promísíme a ihned centrifugujeme (3 000 g, 5 min). Supernatant slijeme.
- Sediment osušíme, resuspendujeme v 300 µl deionizované vody a převedeme do mikrozukavky. Přidáme stejný objem 10 M LiCl a inkubujeme 30 - 60 minut při -20 °C (nebo 10 min při -80 °C).
- Vzniklou sraženinu usadíme centrifugací (13 000 g, 5 min) a supernatant převedeme do nové mikrozukavky.
- Přidáním jednoho objemu 96% ethanolu vysrážíme z roztoku plazmidovou DNA. Inkubujeme nejméně 60 min při -20 °C (nebo 10 min, -80 °C).
- Sraženinu DNA usadíme centrifugací (13 000 g, 5 min). Supernatant slijeme a sediment opláchneme 1 ml 70% ethanolu. Znovu centrifugujeme za stejných podmínek, supernatant odstraníme.

- Sediment necháme oschnout a rozpustíme v 30-200 μ l deionizované vody. Množství izolované DNA a kvalitu izolace zjistíme pomocí elektroforézy.

5.1.2. Elektroforéza DNA v agarózovém gelu

Materiál: agaróza, DNA G Stain (Serva), TAE pufr, marker molekulové hmotnosti DNA

- Připravíme agarózový gel (100 ml) zahříváním práškové agarózy v 1x TAE pufru až do jejího kompletního rozpuštění. Pro dělení fragmentů menších než 800 bp používáme 2% agarózový gel, pro dělení větších fragmentů používáme 1% gel.
- Gel necháme vychladnout na 45 - 50 °C, poté přidáme DNA G Stain (1 μ l do 100 ml gelu) pro detekci DNA v gelu.
- Sestavíme aparaturu pro horizontální gelovou elektroforézu, nalijeme agarózový gel (tloušťka gelu 3 - 5 mm), přidáme hřebínek pro vytvoření jamek a necháme ztuhnout.
- Vyjmeme hřebínek, přelijeme gel 1x TAE puftrem a do jamek v gelu nanášíme vzorky smíchané s nanášecím puftrem (v poměru 10:1) a DNA marker.
- Aparaturu připojíme ke zdroji a necháme dělit DNA při napětí 0,5 - 1,0 V/cm.
- DNA vizualizujeme pomocí UV světla (Vilber Lourmet Transilluminator, 312 nm).
- Z agarózového gelu můžeme izolovat DNA fragmenty pomocí komerčního kitu NucleoSpin® Extract.

5.1.3. Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

Materiál: plasmidová DNA, restrikční enzymy, restrikční pufr, miliporová voda

- V 1,5ml mikrozkuhavce připravíme směs obsahující plasmidovou DNA (0,5 - 2 μ g), restrikční endonukleázy (v množství odpovídajícím množství štěpené DNA a aktivitě endonukleázy v použitém pufru) a restrikční pufr (1/10 objemu reakce); doplníme miliporovou vodou na objem 15 - 20 μ l.
- Reakční směs inkubujeme při 37 °C po dobu 1 - 2 hodin (nebo přes noc).

5.1.4. Ligace fragmentů DNA s přesahujícími konci

Materiál: T4 DNA ligáza, ligační pufr, miliporová voda

- Ligační reakci připravíme v 0,5 ml nebo PCR mikrozkušavce smícháním DNA-vektoru a DNA-inzertu (v poměru koncentrací konců 1:4), T4 DNA ligázy (0,2 μ l), ligačního pufru (1/10 objemu reakce) a doplněním miliporovou vodou na objem 10 - 15 μ l.
- Ligační směs inkubujeme přes noc při teplotě 4 °C (nebo 2 - 4 hodiny při pokojové teplotě) a poté ji můžeme využít k transformaci bakterií.

5.1.5. Transformace bakterií pomocí elektroporace

Materiál: elektrokompetentní bakteriální buňky, plasmidová DNA, LB médium, 20% glukóza, agarové plotny

- Na ledu rozmrazíme elektrokompetentní buňky (připravené předem a skladované v -80 °C), odebereme 40 μ l a smícháme s 4 μ l plasmidové DNA (obsahující 1 - 500 ng DNA). Směs přeneseme (na ledu) do osušené a vychlazené elektroporační kyvety.
- Na přístroji Gene Pulser Aparatus (BioRad, USA) nastavíme napětí 2,5 kV, kapacitanci 25 μ F a odpor 200 Ω a provedeme elektroporaci.
- K bakteriím okamžitě přidáme 1 ml předem připraveného LB média s 2% glukózou a převedeme do 2ml mikrozkušavky.
- Inkubujeme při 37 °C na třepačce (220 rpm) 1 hodinu.
- Bakterie vyséváme na agarové plotny s ampicilinem (obvykle v několika různých množstvích - např. 10 μ l a 100 μ l kultury) a inkubujeme přes noc při 37 °C.

5.2. Afinitní purifikace GST-fúzních proteinů

Materiál: LB médium, 20% glukóza, ampicilin, IPTG, LB1 pufr, LB2 pufr, uvolňovací pufr, inhibitory proteá (bakteriální), 20% TritonX-100, GSH-sepharose, 2x Laemmli pufr, DTT

- Do 50 ml LB média s 1% glukózou a ampicilinem (100 μ g/ml) zaočkujeme bakterie BL21 s pGEX plazmidem nesoucím CrkSH3N a SrcSH3 domény

a samotné GST. Kultivujeme přes noc při teplotě 37 °C za stálého třepání na třepačce (180 rpm).

- Změříme OD inokula (proti čistému LB médiu s 1% glukózou) a zaočkujeme do 125 ml čerstvého LB média s 1% glukózou a ampicilinem (100 µg/ml) tak, aby výsledná hodnota OD byla 0,4. Inkubujeme 2,5 hodiny při 37 °C na třepačce (180rpm).

- Pro negativní kontrolu před expresí indukovaného proteinu odebereme z kultury 1 ml (vzorek1) do 1,5ml mikrozkušavky.

Vzorek centrifugujeme na stolní centrifuze (Eppendorf, 4 000 g, 2 min), opláchneme LB2 pufrům a sediment resuspendujeme v 100 µl LB1 pufru.

- Ve zbytku 125ml kultury indukujeme expresi fúzního proteinu z pGEX plazmidu přidáním IPTG na výslednou koncentraci 1 mM.

Kulturu necháme růst přes noc při pokojové teplotě (nebo 1,5 hodiny při 37 °C) na třepačce (180rpm).

- Odebereme 1 ml kultury (vzorek2) pro kontrolu indukce exprese a zpracujeme stejně jako vzorek1.

- Kulturu ochladíme na ledu, převedeme do 50ml centrifugačních zkumavek a centrifugujeme (Eppendorf, 4 500 g, 10 min, 4 °C).

- Sediment resuspendujeme ve 40 ml LB2 pufru a znovu centrifugujeme (Eppendorf, 4 500 g, 10 min, 4 °C). Supernatant odstraníme.

- Sediment resuspendujeme v 6 ml LB1 pufru s inhibitory proteáz.

- Suspenzi lyzujeme na přístroji French-press (pomocí malého válce, páku nastavíme do polohy “MED” a hodnotu tlaku na 1000).

- Přidáme 20% Triton X-100 v LB1 s inhibitory proteáz na výslednou 1% koncentraci tritonu a inkubujeme přes noc v -20 °C (nebo 25 min při 0 °C).

- Lyzát přeneseme do mikrozkušavek, centrifugujeme (13 000 g, 15 min, 4 °C) a supernatant převedeme do nových zkumavek.

- GST-fúzní proteiny purifikujeme přes kolonku (po celou dobu pracujeme při 4 °C, ideálně v chladovce):

- Kolonku se sítkem menším než je GSH-sefaróza upevníme ke stojanu a nanese na ni 400 µl GSH-sefarózy.

- GSH-sefarózu promyjeme od ethanolu 6 ml LB1 pufru s inhibitory proteáz.
- Naneseme na kolonku bakteriální lyzát.
- Promyjeme kolonku 2 x 6 ml LB1 pufru s inhibitory proteáz.
- Připravíme si pod kolonku jímací mikrozkuhavku a nanese na kolonku 1,5 ml uvolňovacího roztoku.
- Pro kontrolu purifikace odebereme 20 µl získaného roztoku do nové mikrozkuhavky (vzorek3).

Roztok s purifikovanými SH3 doménami můžeme skladovat po přidání inhibitorů proteáz ve 4 °C (maximálně po dobu 1 týdne), nebo v -20 °C.

- Ke kontrolním vzorkům 1, 2 a 3 přidáme v poměru 1:1 2x Laemmli pufr s DTT (1:20). Vzorky povaříme na bločku 10 min při 95 °C a 2 min při 100 °C, nanese na SDS-PAGE gel a elektroforeticky ověříme úspěšnost exprese a purifikace.

5.3. Analýza afinity fluorescenčně značeného inhibitoru k SH3 doménám

Materiál: TBS, TTBS, blokovací pufr ELISA, GST-fúzní SH3 domény, CrkFI

- Do jamek 96-jamkové destičky Corning s hydrofóbním povrchem pipetujeme 150 µl GST-fúzních SH3 domén proteinů Crk a Src a samotného GST v koncentraci 50 µg/ml (od každé domény pipetujeme alespoň dvě řady jamek). Inkubujeme při 4 °C ve vlhké komůrce do druhého dne.
- Nenavázané SH3 domény vylijeme švihem, destičku osušíme přimáčknutím k čistému filtračnímu papíru a 3x promyjeme ponořením do TBS pufru. Po posledním promytí odstraníme všechnu pufr pomocí odsávačky.
- Do všech jamek destičky pipetujeme 275 µl blokovacího pufru ELISA (5% BSA v TBS; pro zjištění nespecifity vazby blokujeme i řady bez imobilizovaných SH3 domén). Blokovací pufr pipetujeme také do jamek nové kultivační 96-jamkové destičky, ve které následně připravíme ředící řadu inhibitoru. Blokujeme 1-2 hodiny při 4 °C.

- Blokovací pufr vylijeme a destičku 3x promyjeme v TTBS pufru, po posledním promytí odsajeme všechnu pufr z jamek odsávacíčkou.
- V kultivační destičce (bez imobilizovaných SH3 domén) připravíme dvojkovou ředící řadu fluorescenčně značeného inhibitoru v 200 μ l TTBS, s výchozí koncentrací inhibitoru v první jamce 15 μ M.
- Pomocí multikanálové pipety přeneseme 150 μ l od každého ředění inhibitoru do jamek destičky s imobilizovanými doménami. Pro zjištění nespecifity vazby inhibitoru pipetujeme i do zablokovaných jamek bez imobilizovaných domén. Inkubujeme ve tmě při laboratorní teplotě na třepačce (300 rpm, 30-6' min).
- 2x promyjeme TTBS pufr a všechnu pufr pečlivě odsajeme. Do všech jamek pipetujeme 150 μ l TBS a změříme intenzitu fluorescence (Tecan Infinite® 200 PRO).

5.4. Stanovení hodnoty IC50

Materiál: TBS, TTBS, blokovací pufr ELISA, GST-fúzní SH3 domény, CrkFI

- Do jamek 1-11 všech řad 96-jamkové destičky Corning pipetujeme 100 μ l GST-fúzní SH3 domény proteinu Crk v koncentraci 50 μ g/ml v TBS (pH 7,4). Do 12. jamky pipetujeme samotné GST o stejné koncentraci. Inkubujeme při 4 °C ve vlhké komůrce do druhého dne.
- Nenavázané SH3 domény a GST vylijeme švihem, destičku osušíme přimáčknutím k čistému filtračnímu papíru a 3x promyjeme ponořením do TBS pufru. Po posledním promytí odstraníme všechnu pufr pomocí odsávacíčky.
- Do všech jamek destičky pipetujeme 275 μ l blokovacího pufru ELISA (5% BSA v TBS) a inkubujeme 1-2 hodiny při 4 °C.
- Blokovací pufr vylijeme a destičku 3x promyjeme v TTBS pufru, po posledním promytí odsajeme všechnu pufr z jamek odsávacíčkou.
- Připravíme si dvojkovou ředící řadu kompetičních domén (Crk a Src GST-fúzní SH3 domény a samotné GST) v TTBS a přeneseme 80 μ l od každého ředění kompetiční domény do jamek 1-10 (každou doménu pipetujeme alespoň do dvou řad destičky), do jamek 11 a 12 pipetujeme 80 μ l samotného TTBS.

- Do všech jamek přidáme 20 μ l roztoku fluorescenčního inhibitoru obsahující takové množství (tj. 20 μ l 5x koncentrovaného roztoku), které je dostatečné pro 50% saturaci GST-fúzních CrkSH3 domén (toto množství (1x koncentraci) si stanovíme předem, viz metoda 5.3.).
Inkubujeme po dobu 30-60 minut v temnotě při pokojové teplotě na třepačce (>300 rpm).
- Promyjeme 2x ponořením do TTBS pufru a nakonec všechny pufr pečlivě odsajeme. Do všech jamek pipetujeme 100 μ l TBS a změříme intenzitu fluorescence (Tecan Infinite® 200 PRO).

5.5. Kultivace savčích buněk

Savčí buňky imortalizovaných buněčných linií kultivujeme na plastových nádobách s povrchem upraveným pro tkáňové kultury v termostatu při teplotě 37 °C a při 5% koncentraci CO₂. Každý den kontrolujeme stav buněk a případnou kontaminaci pomocí mikroskopu (Nikon Eclipse TS 2000).

5.5.1. Rozpěstování buněk ze stabilátů

Materiál: kompletní médium DMEM

- Stabilát uchovaný v kontejneru s tekutým dusíkem rozmrazíme ve vodní lázni, přeneseme do 15ml centrifugační zkumavky s 5 ml kompletního média DMEM předeřátého na 37 °C a centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min).
- Odsajeme médium a buněčný pelet resuspendujeme v 5 ml kompletního média, přeneseme na 10cm kultivační misku s připravenými 5 ml média.
- Buňky kultivujeme na plastových miskách nebo destičkách s upraveným povrchem pro tkáňové kultury v termostatu při 37 °C a 5% koncentraci CO₂. Obvykle jednou za 2-3 dny vyměníme médium za čerstvé. Po dosažení 80-90% konfluency buňky pasážujeme.

5.5.2. Pasážování savčích buněk

Materiál: kompletní médium DMEM, 1x PBS, trypsin-EDTA

- Z misky s narostlými buňkami odsajeme médium a opláchneme ji 2-5 ml 1xPBS.
- Na misku pipetujeme 1/10 objemu trypsinu (1 ml na velkou misku) a inkubujeme v termostatu při 37 °C 5-10 min (kontrolujeme na mikroskopu, zda se buňky oddělily ode dna).
- Působení trypsinu zastavíme přidáním kompletního média DMEM předeřátého na 37 °C. Buňky v médiu resuspendujeme a část suspenze obsahující požadované množství buněk přeneseme na novou misku. Doplníme médium a krouživým pohybem rozprostřeme buňky rovnoměrně po povrchu misky.

5.5.3. Příprava stabilátů

Materiál: kompletní médium DMEM, trypsin-EDTA, 1x PBS, zamrazovací roztok

- Pro přípravu stabilátů necháme buňky narůst na velké (100mm) misce do 100% konfluence.
- Jako při pasážování oddělíme buňky pomocí trypsinu ode dna misky, v 5 ml média je převedeme do 15ml centrifugační zkumavky a centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min).
- Odsajeme médium, buněčný pelet resuspendujeme v 1 ml zamrazovacího roztoku (10% DMSO v FBS) a převedeme do zamrazovací mikrozukavky Nalgene.
- Stabilát rychle umístíme do nádoby s izopropanolem do -80 °C. Druhý den jej přemístíme do kontejneru s tekutým dusíkem.

5.6. Příprava mikroskopických preparátů ze savčích buněk

Materiál: fibronectin, kompletní médium DMEM, 1x PBS, 4% PFA, blokovací roztok, phalloidin, montovací médium

- Připravíme si krycí sklíčka se zdrsňeným povrchem (předem omytá v HCl, opláchnutá vodou a uchovaná v čistém ethanolu). Sklíčka z ethanolu vyndáme, opálíme je a vložíme do jamek 12-ti jamkové destičky.

- Do jamek ke sklíčkům přidáme 0,5 ml roztoku 10 µg/ml fibronectinu ve vodě, inkubujeme přes noc při 4 °C, druhý den odstraníme přebytečný roztok a opláchneme sklíčka DMEM médiem.
- Na sklíčka vysejeme buňky v nízké konfluenci a necháme je růst 2 dny v termostatu při 4 °C a 5% CO₂.
- Po dvou dnech odsajeme nesterilně médium z jamek a sklíčka 2x opláchneme 1x PBS.
- Buňky fixujeme 4% roztokem paraformaldehydu. Přidáme 1 ml roztoku ke každému sklíčku a inkubujeme 15 minut.
- 3x omyjeme sklíčka 1x PBS a přeneseme je na parafilm, tak, aby strana sklíčka porostlá buňkami byla navrchu.
- Na každé sklíčko nanese 200 µl blokovacího roztoku (5% BSA v TBS) a blokujeme 30 - 60 minut.
- Sklíčka přeneseme zpět do jamek 12-jamkové destičky a promýváme 1x PBS 3x10 minut.
- Sklíčka přeneseme na parafilm a na každé pipetujeme 100 µl roztoku phalloidinu (1:50) a inkubujeme 15-30 minut.
- Sklíčka opět přeneseme do jamek 12-jamkové destičky a promýváme 1x PBS 3x10 minut.
- Připravíme si podložní sklíčka a pipetujeme na ně 7µl kapku montovacího média. Krycí sklíčka s buňkami rychle smočíme v destilované vodě, abychom odstranili přebytečné sole, osušíme o buničinu a přiklopíme na kapku montovacího média na podložním sklíčku.

5.7. Příprava lyzátů ze savčích buněk

Materiál: 1x PBS, lyzační pufr, inhibitory proteáz (MixM), inhibitory fosfatáz

- Misku s narostlými buňkami přeneseme z termostatu na led. Odstraníme médium a 2x opláchneme misku ledově vychlazeným 1xPBS.
- Na misku pipetujeme lyzační pufr s inhibitory proteáz a inhibitory fosfatáz (0,5-1 ml na velkou misku; v případě hypotonické lyze použijeme místo lyzačního pufru destilovanou vodu), inkubujeme 10-15 minut na ledě.

- Pomocí škrabky seškrabeme lyzované buňky zisky a převedeme suspenzi do předem vychlazené mikrozkušavky.
- Suspenzi protáhneme 10-12x injekční stříkačkou s jehlou 21G. Injekční stříkačku a jehlu předem vychladíme; pracujeme stále na ledě, abychom zabránili degradaci proteinů.
- Centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5417, 11000 g, 20 min, 4 °C), opatrně odsajeme supernatant a přeneseme jej do čisté mikrozkušavky*. Lyzát můžeme skladovat při -20 °C.

* Při hypotonické lyzi při přípravě lyzátů pro analýzu vstupu CrkFI do buněk odsáváme supernatant tenkou jehlou, tak, abychom nenabrali frakci membránových lipidů, která je viditelná na hladině supernatantu. Intenzitu fluorescence v lyzátech měříme pomocí fluorometru (Tecan Infinite® 200 PRO).

5.8. Stanovení koncentrace proteinů - Folinova metoda

Materiál: kit DC™ Protein Assay, BSA, lyzační pufr

Proteinové koncentrace lyzátů určíme kolorimetricky s využitím komerčního kitu DC™ Protein Assay (Bio-Rad, USA).

- Připravíme roztok A' přidáním 20 µl roztoku S k 1 ml roztoku A.
- Připravíme několik ředění (od 0,2 mg/ml do 1,5 mg/ml) proteinového standardu - BSA, ve stejném pufru, jako vzorky.
- Do jamek 96-jamkové destičky pipetujeme v triplicátech 1-3 µl vzorku nebo proteinového standardu. Do každé jamky přidáme 25 µl roztoku A' a 200 µl roztoku B. Promísíme jemným zatřesením destičkou a inkubujeme 15 minut.
- Změříme absorbanci při 750 nm (Tecan Infinite® 200 PRO).
- Hodnoty absorbance proteinových standardů využijeme k vytvoření kalibrační křivky závislosti proteinové koncentrace na absorbanci, ze které odečteme hodnoty koncentrace vzorků.
- Koncentrace lyzátu srovnáme pomocí lyzačního pufru.

5.9. SDS-polyakrylamidová elektroforéza (SDS-PAGE)

Materiál: 4x Tris/SDS pH 8,8; 4x Tris/SDS pH 6,8; protogel; TEMED; 10% APS; SDS pufr; destilovaná voda; 6x Laemmli pufr; DTT; CBB barvicí roztok; odbarvovací roztok

SDS-PAGE elektroforézu provedeme na soupravě Bio-Rad Mini Protean III Cell.

- Připravíme 10-15% separační gel (podle velikosti dělených proteinů):

na 1 separační gel, 1mm široký				na 1 zaostřovací gel, 1mm široký	
	7,5 %	10 %	15 %		
destilovaná voda	5 ml	4,17 ml	2,5 ml	destilovaná voda	1,55 ml
4x Tris/SDS pH 8,8	2,5 ml			4x Tris/SDS pH 6,8	625 µl
protogel	2,5 ml	3,33 ml	5 ml	protogel	325 µl
TEMED	6,7 µl			TEMED	2,5 µl
10% APS	33 µl			10% APS	12,5 µl

- Separací gel ihned naléváme do předem sestavené soupravy pro nalévání gelů, převrstvíme vodou a necháme ztuhnout (cca 30 min).
- Odsajeme vodu převrstvující separační gel a převrstvíme ho zaostřovacím gelem, zasuneme vhodný hřeben na vytvoření jamek a necháme ztuhnout (cca 20 min).
- Po ztuhnutí vyndáme hřebínek z gelu a sestavíme aparaturu pro elektroforézu. Do aparatury nalijeme SDS pufr, kterým také promyjeme jamky v gelu (pomocí injekční stříkačky s jehlou nebo mikrostříkačky Hamilton).
- Vzorky před nanesením na gel smícháme s 1/4 objemu 6x Laemmli pufru a 1/20 objemu DTT a inkubujeme 5 minut na bločku předehřátém na 95°C.
- Vzorky a marker molekulových hmotností nanášíme na gel, poté připojíme aparaturu ke zdroji elektrického napětí. Elektroforéza probíhá za konstantního proudu 15mA (na jeden gel). Poté, co čelo elektroforézy překročí rozhraní mezi zaostřovacím a separačním gelem (vzorky se zaostřily), zvýšíme proud na dvojnásobek.
- Po ukončení elektroforézy můžeme detekovat rozdělené proteiny v gelu barvením v roztoku Coomassie Brilliant Blue (barvíme cca 30 minut,

poté odbarvujeme přes noc v odbarvovacím roztoku), nebo proteiny přeneseme z gelu na nitrocelulózovou membránu pomocí Western blotu.

5.10. Western blot

Materiál: nitrocelulózová membrána, transferový pufr, TBS, Ponceau S

Pro Western blot použijeme soupravu Bio-Rad Trans-blot.

- V nádobě s transferovým pufrem sestavíme „sandwich“ pro přenos proteinů z gelu na nitrocelulózovou membránu - na desku, která bude v aparatuře mířit ke katodě, klademe na sebe v následujícím pořadí: houbičku, filtrační papír Whatman, gel s rozdělenými proteiny, nitrocelulózovou membránu, filtrační papír Whatman, houbičku. Přiklopíme druhou částí desky a umístíme do aparatury, přelijeme transferovým pufrem. Aparaturu připojíme ke zdroji elektrického napětí.
- Western blot probíhá při konstantním napětí 100 V po dobu 1,5 hodiny za stálého chlazení.
- Po ukončení přenosu opláchneme membránu v TBS a můžeme ji obarvit pomocí barvy Ponceau S pro kontrolu přenosu proteinů (obarvujeme 5 minut na překlápěčce, poté odmyváme barvu destilovanou vodou až do úplného odbarvení).

5.11. Imunodetekce proteinů na membráně

Materiál: blokovací roztok, TBS, TTBS, BSA, primární protilátky, sekundární protilátky; Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate kit

- Nitrocelulózovou membránu, na kterou byly přeneseny proteiny, blokujeme v 5% BSA v TBS při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny. V případě potřeby před blokováním rozstříháme podle markeru molekulových hmotností membránu na proužky odpovídající jednotlivým detekovaným proteinům.
- Membránu opláchneme v TBS (3x10 min) a zatavíme ji do folie s dostatečným množstvím primární protilátky v roztoku 1% BSA v TTBS, inkubujeme přes noc při 4° C.

- Membránu opláchneme v TTBS (3x10 min) a inkubujeme 1 hodinu se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou v roztoku 1% BSA v TTBS.
- Membránu opláchneme v TTBS (3x10 min) a v TBS (5 min), poté ponoříme do vyvíjecího roztoku se substrátem pro křenovou peroxidázu a luminiscenční signál vyvoláme na přístroji LAS 4000 (Fujifilm, Japonsko).

5.12. Buněčné analýzy

5.12.1. Invazivita buněk ve 3D kolagenu

Materiál: NaHCO_3 , 10x HMEM, 1x PBS, kolagen R, 1M NaOH, kompletní médium DMEM, bezsérové médium DMEM, trypsin-EDTA, klávkovaná miliporová voda, CrkI

- Na ledu připravíme 1% kolagenový gel smícháním 40 μl NaHCO_3 , 40 μl 10xHMEM, 230 μl 1xPBS, 105 μl kolagenu R a 3 μl 1M NaOH (pokud má směs správné pH, měla by mít sytě růžovou barvu; pokud má gel žlutou barvu, upravíme pH přidáním více NaOH).
- Směs pečlivě promísíme pomocí pipety (nevortexujeme, pracujeme stále na ledu) a nanášíme 10 μl na jamku na destičku IBIDI Angiogenesis. Necháme gel zpolymerovat v termostatu (asi 20-30 minut).
- Buňky trypsinizujeme jako při pasážování (viz metoda 5.9.2.) a převedeme v 5 ml média do 15ml centrifugační zkumavky. Centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min), odsajeme médium a opláchneme buňky od zbývajících trypsinu resuspendováním v 5 ml média a další centrifugací za stejných podmínek.
- Odsajeme médium a buněčný pelet resuspendujeme v 1-3 ml média (podle velikosti peletu).
- Pomocí Neubauerovy komůrky spočítáme množství buněk v 1 ml suspenze a připravíme 1 ml suspenze o koncentraci 2×10^5 buněk/ml. K suspenzi přidáme inhibitor CrkSH3N domény v požadované koncentraci.

- Nanášíme 50 µl buněčné suspenze na jamku IBIDI destičky se zpolymerovaným kolagenem. Inkubujeme v termostatu ve vlhké komůrce (37 °C, 5% CO₂), dokud buňky nepřisednou na kolagen (minimálně 3-4 hodiny nebo přes noc).
- Po přisednutí buněk vyměníme médium v jamkách za médium bez séra (do bezsérového média přidáme příslušné množství inhibitoru). Inkubujeme v termostatu (37 °C, 5% CO₂).
- Po třech dnech pořídíme snímky kolagenu v několika hloubkách (od povrchu v krocích po 10 µm; mikroskop Nikon Eclipse; zvětšení 20x). Analyzujeme počet zaostřených buněk na snímcích z jednotlivých hloubek a množství nezainvadovaných buněk (tj. počet buněk, které zůstaly přisedlé na povrchu kolagenu) a vyhodnotíme relativní index invazivity.

Index invazivity je vypočten jako součet násobků počtu buněk a hloubky, do které zamigrovaly, vztažený na celkové množství buněk:

$$\text{index invazivity} = \frac{\sum \text{množství buněk zamigrovaných do hloubky } h \cdot \text{hloubka } h \text{ v } \mu\text{m}}{\text{celkové množství buněk ve všech hloubkách}}$$

Pro porovnání mezi jednotlivými experimenty stanovíme relativní index invazivity: index invazivity v každém experimentu normalizujeme hodnotou indexu invazivity kontrolních buněk neopůsobených inhibitorem.

5.12.2. Migrace buněk ve 2D prostředí - „wound-healing“ test

Materiál: kompletní médium DMEM, CrKI

- Pro test migrace „wound healing“ necháme buňky konfluentně narůst na 60mm misce nebo v 6-jamkové destičce.
- Pomocí modré špičky nasazené na odsávačce vytvoříme v konfluentní vrstvě buněk ránu („scratch“). Po vytvoření rány odsajeme médium z misky, opatrně ji opláchneme médiem, které znovu odsajeme. Doplníme na misku čerstvé médium a pomocí mikroskopu (Nikon Eclipse; zvětšení 4x) pořídíme obrázek rány v čase t_0 .
- Inkubujeme v termostatu (37 °C, 5% CO₂) po dobu 6-24 hodin (dobu závisí na rychlosti migrace buněk), poté pořídíme obrázek rány v čase t a vyhodnotíme

míru jejího zacelení, tedy rozdíl v ploše rány v čase t_0 (hned po jejím vytvoření) a v čase t . Míru migrace určíme jako procento plochy rány, která byla obsazena buňkami.

5.12.3. Analýza cytotoxicity inhibitoru - alamarBlue® test

Materiál: kompletní médium DMEM, trypsin-EDTA, alamarBlue® (Invitrogen, USA), Crkl

- Buňky narostlé do 70-80% konfluence na velké misce trypsinizujeme (jako při pasážování), přidáme 4 ml média, převedeme do 15ml centrifugační zkumavky a centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min).
- Supernatant odsajeme a buněčný pelet opláchneme v 6 ml média.
- Supernatant odsajeme a buněčný pelet resuspendujeme v 2-6 ml média (podle velikosti peletu).
- Pomocí Neubauerovy komůrky stanovíme počet buněk v suspenzi.
- Na 96-jamkovou destičku pipetujeme v hexaplikátech 1000 buněk na jamku ve 100 μ l média a 100 μ l samotného média jako blank a pro negativní kontrolu.
- Buňky necháme přisednout přes noc v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂).
- Druhý den z jamek s buňkami odsajeme médium a pipetujeme 100 μ l média s inhibitorem; inkubujeme v inkubátoru po dobu 24-72 hodin.
- Po uplynutí požadované doby přidáme k médiu 1/10 objemu (tj. 10 μ l) alamarBlue® a inkubujeme v inkubátoru po dobu 1 hodiny. AlamarBlue® přidáme i do jamek obsahujících médium pro negativní kontrolu (0% redukce alamarBlue®), nepřidáváme k blanku.
- Na spektrometru (Tecan Infinite® 200 PRO) změříme absorbanci při vlnové délce 570 nm s referenčním měřením při vlnové délce 600 nm.

AlamarBlue® (Invitrogen, USA) je kolorimetrický oxidačně-redukční indikátor používaný k detekci metabolické aktivity buněk. Růst buněk je doprovázen chemickou redukcí prostředí, na což alamarBlue® reaguje změnou barvy při přechodu z oxidovaného stavu (modrý, absorpční maximum při 600 nm) na redukovaný (červený, 570 nm). Dochází tedy k posunu v absorbanci těchto dvou vlnových délek, a to v míře, která je přímo úměrná množství přítomných buněk. Relativní cytotoxicita inhibitoru

při dané koncentraci byla určena rozdílem v absorbanci při 570/600 nm vztaženým k negativní kontrole, která obsahuje buňky bez inhibitoru.

5.12.4. Analýza schopnosti buněk růst bez ukotvení k podkladu

Materiál: Agar noble (Sigma, USA), 2x DMEM, trypsin-EDTA, kompletní médium DMEM, Crkl

- Buňky trypsinizujeme (viz metoda 5.9.2.) a převedeme v 5 ml média do 15ml centrifugační zkumavky. Centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min).
- Odsajeme médium a buněčný pelet resuspendujeme v 1-3 ml média (podle velikosti peletu). Pomocí Neubauerovy komůrky spočítáme množství buněk v 1 ml suspenze.
- Připravíme si 1,6% agar rozehrátím v mikrovlnné troubě. Agar a 2x DMEM udržujeme ve vodní lázni při teplotě 45 °C.
- 1,6 % agar smícháme v poměru 1:1 s 2x DMEM. Pipetujeme 1,5 ml získaného 0,8% agaru do jamek 6-jamkové destičky a necháme ztuhnout.
- Připravíme si 0,4% agar smícháním 0,8% agaru a 1x DMEM. V něm resuspendujeme 1000-2000 buněk/jamku a přidáme inhibitor. 1,5 ml směsi pipetujeme rovnoměrně na podkladový agar v 6-jamové destičce.
- Po ztuhnutí agar převrstvíme 1x DMEM s přidaným inhibitorem.
- Inkubujeme v termostatu při 37 °C, 5% CO₂ po dobu 14 dnů; 2-3x týdně přidáme 0,5 -1 ml čerstvého média s inhibitorem.
- Naskenujeme jamky s rozlišením 1200 dpi a vyhodnotíme množství a velikost kolonií pomocí programu NIS-Elements.

5.12.5. Zymografie

Materiál: kompletní médium DMEM; bezsérové médium DMEM; trypsin-EDTA; CrkI; gelatin; 4x Tris/SDS pH 8,8; 4x Tris/SDS pH 6,8; protogel; TEMED; 10% APS; SDS pufr; destilovaná voda; 4x Laemmli pufr; renaturační pufr, aktivační pufr; CBB barvicí roztok; odbarvovací roztok

- Buňky trypsinizujeme (viz metoda 5.9.2.) a převedeme v 5 ml média do 15ml centrifugační zkumavky. Centrifugujeme (Eppendorf Centrifuge 5804R, 180 g, 3 min).
- Odsajeme médium a buněčný pelet resuspendujeme v 1-3 ml média (podle velikosti peletu). Pomocí Neubauerovy komůrky spočítáme množství buněk v 1 ml suspenze.
- Do jamek 24-jamkové destičky nanese 50000, 100000 a 200000 buněk v 500 µl. Inkubujeme v termostatu do druhého dne.
- Druhý den odsajeme médium a 2x opláchneme buňky bezsérovým médiem, do každé jamky přidáme 300 µl bezsérového média.
- Po 24, 48 a 72 hodinách odebereme 30 µl vzorek média z jamek s buňkami a uložíme do -70 °C.
- Připravíme si 10% SDS-PAGE gel s gelatinem (finální koncentrace gelatinu 2 mg/ml), převrstvíme vodou, necháme ztuhnout a vodu vyměníme za zaostřovací gel, připravený jako při běžné SDS-PAGE.

na 2 separační gely, 1,5 mm široké	
gelatin 5 mg/ml	6 ml
destilovaná voda	0,25 ml
4x Tris/SDS pH 8,8	3,75 ml
protogel	5 ml
TEMED	10 µl
10% APS	50 µl

- Připravíme vzorky smícháním 7 µl 4x Laemmli pufru a 23 µl vzorku, pracujeme na ledu, nepřidáváme DTT a vzorky nevaříme!

- Naneseme vzorky na gel a spustíme elektroforézu. Elektroforézu necháme probíhat při 4 °C při maximálním proudu 15-20 mA.
- Po skončení elektroforézy renaturujeme proteiny inkubací gelu 2x 1 hodinu v tritonovém pufru při pokojové teplotě. Poté gel opláchneme destilovanou vodou a inkubujeme do druhého dne (15-20 hodin) při 37 °C v azidovém pufru, který aktivuje metaloproteázy.
- Gel obarvíme pomocí Coomassie Brilliant Blue (CBB).

5.13. Statistická analýza dat

Statistická analýza experimentálních dat byla provedena pomocí Studentova dvouvýběrového dvoustranného t-testu v programu MS Excel.

Signifikantní rozdíly mezi výběry jsou v grafech značeny pomocí hvězdiček, na základě hladiny významnosti (*p-value*):

$p < 0,05$	*
$p < 0,01$	**
$p < 0,001$	***

6. VÝSLEDKY

Cílem této práce je analyzovat vliv inhibice N-terminální domény proteinu Crk na invazivní vlastnosti buněk. Jako inhibitor byl zvolen kompetitivní peptoid, který se váže na CrkSH3N s vysokou afinitou. Tento inhibitor je v nanomolárních koncentracích schopen narušit interakci CrkSH3N a kinázy Abl *in vitro* (Nguyen et al., 2000). Jeho efekt na signalizaci a chování buněk doposud nebyl testován. Pro buněčné analýzy jsme zvolili myší embryonální fibroblasty transformované konstitutivně aktivní kinázou Src (buněčné linie SC a S15F). Vlivem aktivity kinázy Src je v SC buňkách zvýšená fosforylace proteinu p130Cas a tedy tvorba p130Cas/Crk komplexu, což se projevuje na zvýšeném invazivním potenciálu SC buněk. Buňky linie S15F exprimují mutantní formu p130Cas, u které jsou tyrozíny patnácti CrkSH2 vazebných motivů (Y-x-x-P) substrátové domény nahrazeny nefosforylovatelným fenylalaninem. V S15F tedy nemůže docházet k tvorbě p130Cas/Crk komplexu a signalizace stimulující invazivitu buněk je zablokována, obdobně jako při inhibici CrkSH3N domény pomocí kompetitivního inhibitoru. S15F tedy mohou sloužit jako pozitivní kontrola efektu inhibitoru na SC buňky.

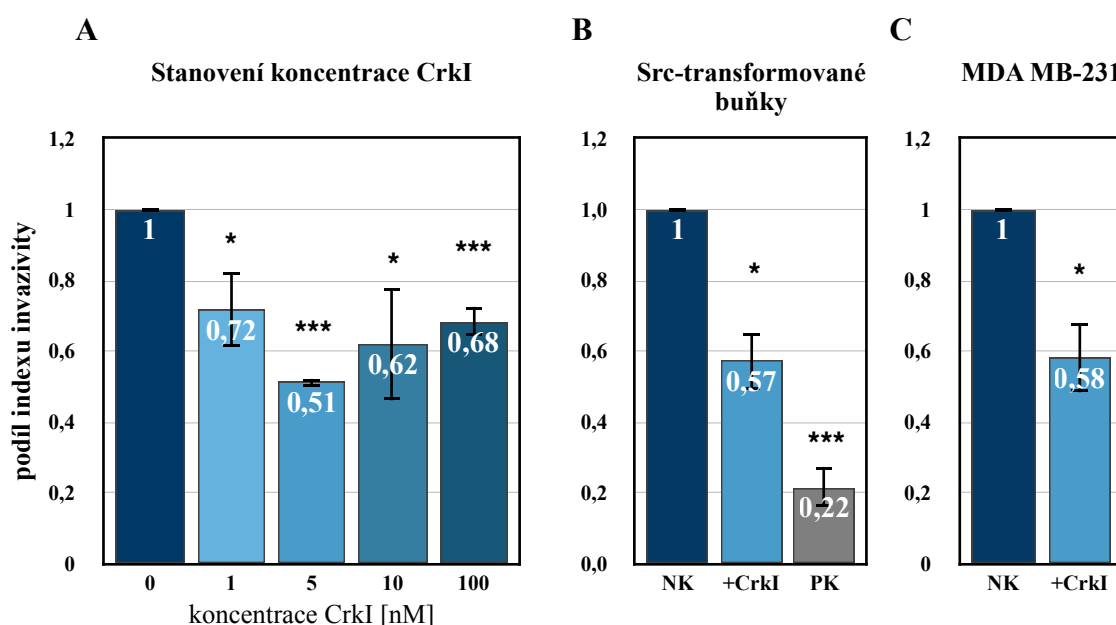
6.1. Efekt inhibice CrkSH3N na invazivitu buněk

Buněčná invazivita, tedy schopnost buněk prostupovat skrz tkáň, je klíčová vlastnost umožňující nádorovým buňkám vytvářet metastázy. Signalizace proteinu Crk přispívá k invazivitě buněk ve 3D prostředí, esenciální je přitom tvorba komplexu p130Cas/Crk. V souladu s tím S15F buňky, u kterých je tvorba tohoto komplexu znemožněna, vykazují oproti SC buňkám výrazně sníženou invazivitu (Brábek et al., 2005). Analyzovali jsme proto efekt inhibice CrkSH3 domény na schopnost buněk invadovat do kolagenové matrice pomocí testu buněčné invazivity ve 3D kolagenu (viz kapitola *Metody*, 5.12.1.).

Nejprve bylo nutné stanovit koncentraci inhibitoru CrkSH3N domény (dále označován jako CrkI), která je nejvhodnější pro inhibici invazivity buněk transformovaných Src (viz *Obr. 6.1A*). Z testovaných koncentrací CrkI v rozsahu 1-100 nM jsme největší pokles invazivity pozorovali při použití inhibitoru v 5nM koncentraci.

U vyšších koncentrací dochází k zeslabení inhibičního efektu. Inhibitor v 5nM koncentraci je schopen snížit invazivitu SC buněk o polovinu. Invazivita S15F buněk, které byly do experimentu zařazeny jako pozitivní kontrola funkce inhibitoru, je oproti invazivitě SC buněk snížena ještě více, na méně než čtvrtinu (viz *Obr. 6.1B*). Dále jsme se rozhodli ověřit, zda má inhibitor obdobný efekt i na invazivní vlastnosti lidských rakovinných buněk. Zvolili jsme buňky linie odvozené od nádoru prsu, MDA-MB 231. I u této buněčné linie vedlo opůsobení buněk inhibitorem v 5nM koncentraci k poklesu invazivity ve srovnatelné míře jako u SC buněk (viz *Obr. 6.1C*).

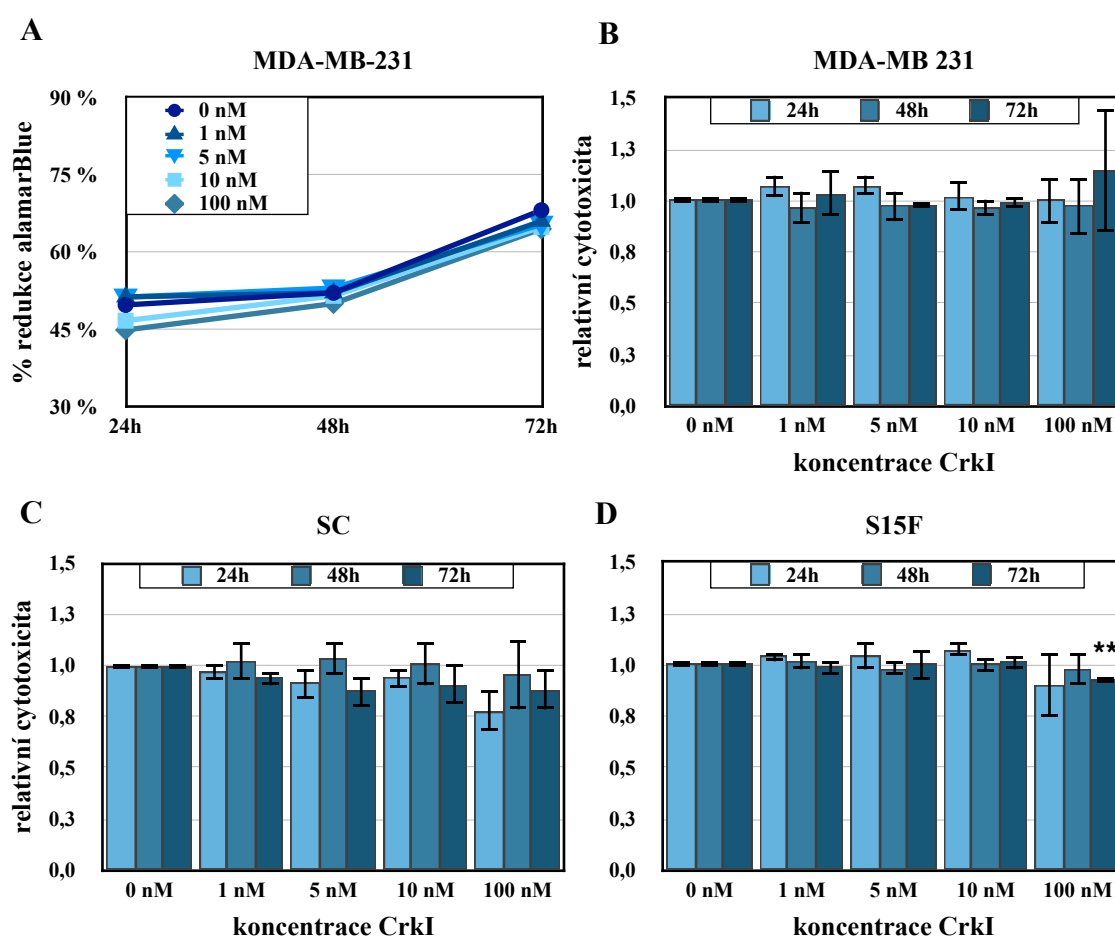
Tyto výsledky tedy ukazují, že kompetitivní inhibitor CrkSH3N domény je schopen v nanomolárních koncentracích snižovat invazivní potenciál buněk.



Obr. 6.1: Vliv inhibice CrkSH3N na invazivitu buněk. 10^4 buněk v médiu s CrkI bylo vysazeno na jamku s polymerovaným 3D kolagenem (viz kap.5.12.1.). Po 72 h byly pořízeny snímky kolagenu a byl vyhodnocen index invazivity, který je v grafu vyjádřen v poměru k indexu invazivity buněk bez CrkI. **A** Stanovení koncentrace CrkI vhodné k inhibici invazivity. SC buňky byly opůsobeny CrkI v koncentraci 0-100 nM. Největší efekt na inhibici má CrkI v 5nM koncentraci. **B** Vliv CrkI na invazivitu Src-transformovaných buněk. *NK*: SC buňky neopůsobené CrkI; *+CrkI*: SC s 5 nM CrkI; *PK*: S15F buňky. Inhibice CrkSH3 domény vede ke snížení invazivity, podobně jako neschopnost tvořit p130Cas/Crk komplex u S15F buněk. **C** CrkI inhibuje invazivitu MDA MB-231 buněk. *NK*: MDA MB-231 buňky neopůsobené CrkI; *+CrkI*: MDA MB-231 s 5 nM CrkI. Data jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů, v každém bylo analyzováno min. 300 buněk pro každou experimentální podmínku. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku; statisticky signifikantní rozdíly jsou znázorněny pomocí hvězdiček: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

6.2. Analýza cytotoxicity inhibitoru CrkSH3N domény

Abychom ověřili, že pozorovaný efekt inhibitoru na invazivitu buněk není způsoben jeho případným vlivem na proliferaci buněk, analyzovali jsme jeho cytotoxicitu pomocí alamarBlue® testu proliferace (viz kapitola *Metody*, 5.12.3.). Sledovali jsme vliv CrkI v koncentracích 1-100 nM na proliferaci buněk linií SC, S15F a MDA MB-231 po 24-78 hodinách inkubace s inhibitorem. Z grafu 6.2A je patrné, že proliferace buněk linie MDA-MB-231 v čase není ovlivněna přítomností inhibitoru. Z důvodu rozdílné proliferace buněk během jednotlivých experimentů jsme pro porovnání mezi



Obr. 6.2: Cytotoxicita CrkI. Vliv CrkI na proliferaci byl stanoven pomocí alamarBlue® testu (viz kap.5.12.3.). Na 96-jamkovou destičku bylo vysazeno 1000 buněk, po jejich přisednutí byl přidán CrkI v daných koncentracích. Množství buněk bylo vyhodnoceno po 24, 48 a 72 hod. **A** Vliv CrkI na proliferaci MDA-MB-231 buněk. Množství buněk je přímo úměrné % redukce alamarBlue®. *Graf představuje reprezentativní výsledek jednoho ze tří nezávislých experimentů.* **B** Cytotoxicita CrkI u MDA-MB-231 buněk. Relativní cytotoxicita vyjadřuje viabilitu buněk v přítomnosti inhibitoru vztaženou k viabilitě kontrolních buněk (0 nM CrkI) v daný čas. **C** Cytotoxicita CrkI u SC buněk. **D** Cytotoxicita CrkI u S15F buněk. Inkubace S15F s 100 nM CrkI po dobu 3 dní vede k poklesu proliferace o 7,5 %. V ostatních případech nebyl pozorován vliv CrkI na proliferaci. *Data jsou průměrem ze tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky vyjadřují směrodatnou odchylku; statisticky signifikantní rozdíl ($p=0,008$) je znázorněn pomocí hvězdiček **.*

experimenty stanovili relativní cytotoxicitu inhibitoru (*Obr. 6.2B-D*). Relativní cytotoxicita udává množství buněk v přítomnosti inhibitoru vztažené k množství neopůsobilých buněk v daném čase.

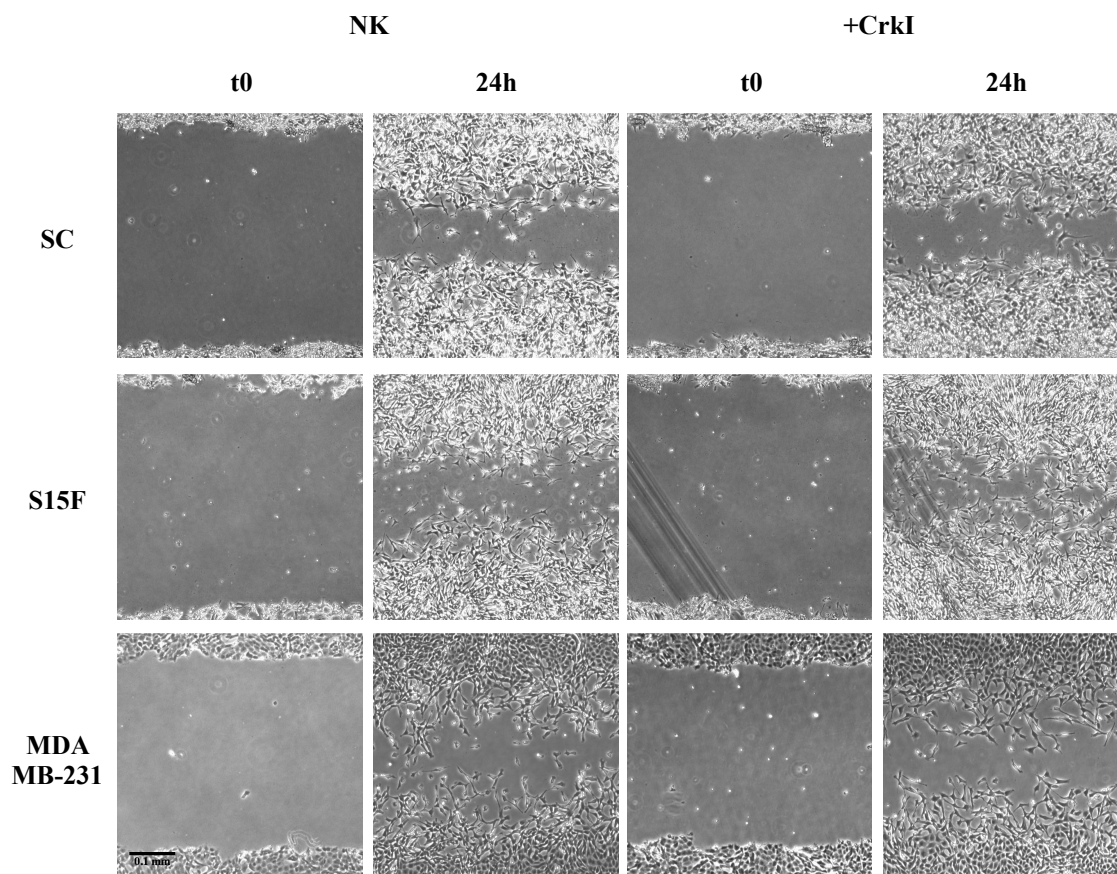
Na základě testu invazivity jsme stanovili 5nM koncentraci CrkI jako vhodnou pro inhibici invazivity (viz *Obr. 6.1A*) a tato koncentrace byla nadále používána ve všech ostatních buněčných testech. Test proliferace ukázal, že při této koncentraci nevykazuje CrkI cytotoxický efekt vůči buňkám žádné z testovaných linií (viz *Obr. 6.2A-D*). Jako statisticky významný se jeví pouze mírný pokles viability (o 7,5 %) u S15F buněk po třídní inkubaci se 100nM CrkI (viz *Obr. 6.2D*).

Z těchto výsledků je patrné, že pozorovaný efekt CrkI na invazivitu buněk není ovlivněn rozdílnou viabilitou v přítomnosti inhibitoru.

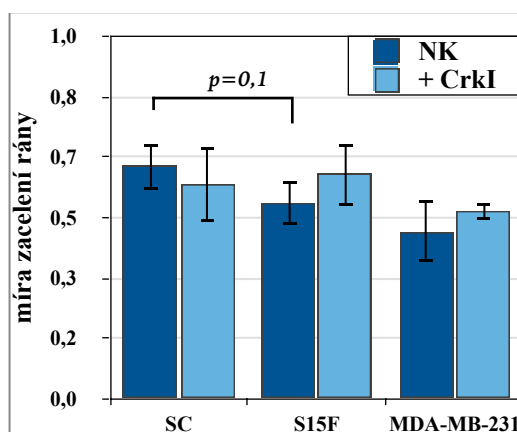
6.3. Vliv inhibitoru CrkSH3N domény na migraci buněk

Schopnost migrovat je nezbytnou vlastností mnohých buněk. Migrace buněk je pevně spjatá s invazivitou nádorových buněk, je ovšem důležitá také při mnohých fyziologických procesech, například při hojení ran nebo během vývoje. Protein Crk se podílí na signalizaci vedoucí k regulaci buněčného pohybu a komplex p130Cas/Crk byl označen jako molekulární spínač migrace (Cho a Klemke, 2000). Analyzovali jsme tedy vliv inhibice CrkSH3N domény na migraci SC, S15F a MDA MB-231 buněk. Cílem bylo ověřit, zda inhibitor v 5nM koncentraci, při které je schopen snížit invazivitu buněk ve 3D kolagenu, ovlivňuje i migraci ve 2D. Pro testování migrace jsme použili test „wound healing“ (hojení rány; viz kapitola *Metody 5.12.2.*).

Jak je patrné z *obr. 6.3.1* a *grafu 6.3.2*, CrkI v 5nM koncentraci nemá vliv na migraci buněk žádné z buněčných linií SC, S15F a MDA-MB-231. Bylo ukázáno, že narušení tvorby p130Cas/Crk komplexu nefosforylovatelnou mutací tyrozínových motivů substrátové domény p130Cas vede ke snížení migrace indukované fibronektinem (Shin et al., 2004; Meenderink et al., 2010). Naše výsledky také naznačují mírně sníženou míru migrace u S15F v porovnání s migrací buněk SC linie, nicméně tento rozdíl není statisticky významný ($p = 0,1$; viz *Obr. 6.2*).



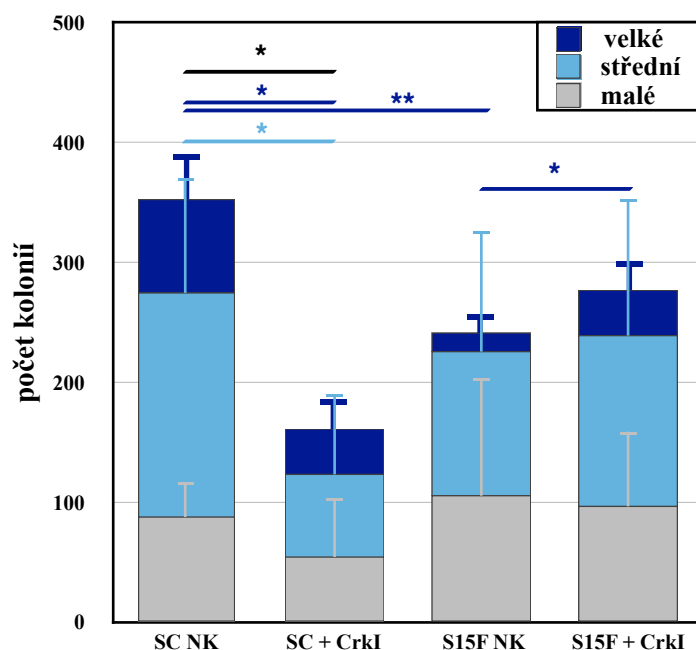
Obr. 6.3.1: Vliv Crkl na migraci buněk - test „wound healing“. V konfluentní vrstvě buněk byla vytvořena rána (*t0*). Po 24 hodinách, kdy buňky migrovaly do rány, byl pořízen snímek (*24h*) a byla vyhodnocena míra zacelení rány (viz Obr.6.3.2). U žádné z buněčných linií SC, S15F, MDA-MB-231 nebyla pozorována změna migrace buněk v přítomnosti 5nM Crkl (+Crkl, vpravo) oproti kontrolním buňkám bez Crkl (NK, vlevo). Snímky byly pořízeny na mikroskopu Nikon Eclipse při zvětšení 10x; měřítko v levém dolním rohu odpovídá délce 0,1 mm. Prezentované snímky představují reprezentativní výsledek ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 6.3.2: Vliv Crkl na migraci buněk. Migrace kontrolních buněk (NK; tmavé sloupce) a buněk v přítomnosti 5 nM Crkl (+ Crkl; světlé sloupce) byla analyzována pomocí testu „wound healing“. V konfluentní vrstvě buněk byla vytvořena rána a po 24 hodinách byla stanovena míra zacelení rány buněk jako % plochy rány, do které za daný čas buňky zamigrovaly. U žádné z buněčných linií SC, S15F a MDA MB-231 nebyl pozorován vliv inhibitoru na migraci. Migrační potenciál S15F je mírně snížen oproti SC buňkám ($p=0,1$). Data pocházejí ze tří nezávislých experimentů.

6.4. Vliv inhibice CrkSH3N domény na schopnost buněk růst nezávisle na podkladu

K typickým vlastnostem nádorových buněk patří jejich rezistence vůči anoikis, tedy buněčné smrti vyvolané ztrátou kontaktu se složkami extracelulární matrix. Tato schopnost přispívá také k metastatickému potenciálu nádorových buněk. Schopnost buněk růst a vytvářet kolonie v prostředí bez možnosti přichycení k podkladu je často používaným měřítkem tumorigenicity buněk. Netransformované buňky v takovém prostředí umírají a kolonie se netvoří. Protein Crk přispívá k přežívání buněk v podmínkách indukujících buněčnou smrt (Kain et al., 2003). Analyzovali jsme tedy vliv inhibitoru CrkI na schopnost buněk růst nezávisle na podkladu pomocí testu růstu buněk v 0,4% měkkém agaru. Počet a velikost kolonií vytvořených buňkami v daných podmínkách se mezi jednotlivými experimenty lišily, ale všechny experimenty vykazovaly jednotný trend (viz Obr. 6.4). U buněk SC linie dochází při opůsobení buněk 5 nM CrkI k poklesu celkového počtu kolonií v průměru o polovinu oproti

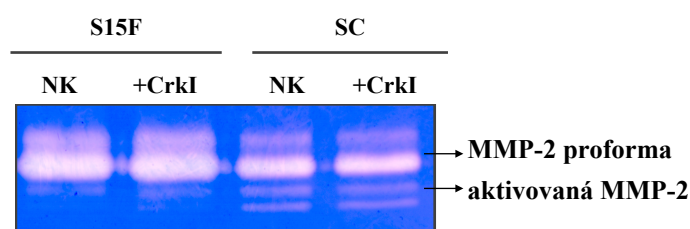


Obr. 6.4: Test schopnosti buněk růst nezávisle na podkladu. 1000 buněk bylo po dobu 14 dnů kultivováno v měkkém 0,4% agaru na 6-jamkové destičce v přítomnosti 5 nM CrkI (+CrkI) nebo bez inhibitoru (NK). Poté byl vyhodnocen počet kolonií vytvořených buňkami linií SC a S15F za daných podmínek. Kolonie byly rozděleny do kategorií podle jejich velikosti: malé (menší než 250 μm^2), střední (250 μm^2 - 500 μm^2) a velké (větší než 500 μm^2). Pozorovali jsme pokles počtu kolonií na polovinu u SC buněk opůsobených CrkI (SC + CrkI) oproti kontrolním SC bez inhibitoru (SC NK). U S15F buněk naopak CrkI výrazně ale podpořil tvorbu velkých kolonií. Graf ukazuje průměrný výsledek tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky naznačují směrodatnou odchylku, signifikantní rozdíly v počtu kolonií jsou označeny pomocí hvězdiček barvy odpovídající dané kategorii (černá pro celkový počet kolonií) podle hladiny pravděpodobnosti: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$).

neopůsobeným kontrolním buňkám ($p < 0,05$). Nejvýraznější je přitom rozdíl v množství středních ($>250 \mu\text{m}^2$) a velkých ($>500 \mu\text{m}^2$) kolonií. S15F buňky vytváří jen pětinu velkých kolonií ($>500 \mu\text{m}^2$) oproti SC ($p < 0,01$). Ošetření buněk linie S15F inhibitorem nevede k signifikantní změně v celkovém počtu kolonií, ale dochází k signifikantnímu nárůstu počtu velkých kolonií ($p < 0,05$). Tyto výsledky ukazují, že CrkI dokáže inhibovat schopnost růst nezávisle na podkladu u buněk transformovaných Src. Pokud ale v buňkách nedochází k tvorbě p130Cas/Crk komplexu, jako je tomu u S15F buněk, indukuje inhibice CrkSH3N domény tvorbu velkých kolonií v měkkém agaru.

6.5. Inhibice CrkSH3N a produkce matrixových metaloproteáz

Matrixové metaloproteázy (MMPs) jsou buňkami sekretované proteolytické enzymy, které degradují složky extracelulární matrix. Degradace extracelulární matrix přispívá k metastatickému potenciálu buněk (Liotta et al, 1980). Crk se podílí na signalizaci regulující expresi MMPs (Hasegawa et al., 2009; Garcia-Guzman et al., 1999; viz kapitola 3.4.3.). MMPs jsou sekretovány jako neaktivní proformy, které jsou následně v extracelulární matrix aktivovány štěpením. Pokud je blokována signalizace p130Cas/Crk komplexu, jako je tomu v S15F buňkách, dochází k poklesu v aktivaci metaloproteázy MMP-2 (Brábek et al., 2005), přestože množství produkované proformy MMP-2 se nemění. Analyzovali jsme tedy vliv inhibice CrkSH3N na produkci a aktivaci MMP-2 metodou gelatinové zymografie. Nepozorovali jsme žádný signifikantní rozdíl mezi kontrolními SC buňkami a buňkami opůsobenými 5 nM CrkI.

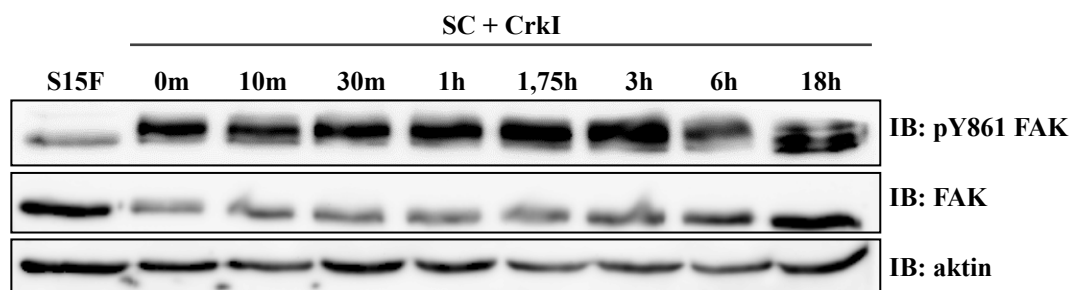


Obr. 6.5: Vliv CrkI na aktivaci MMP-2. S15F a SC buňky byly kultivovány v přítomnosti 5nM CrkI (+CrkI) nebo bez CrkI (NK) po dobu dvou dnů, poté byly odebrány vzorky média a naneseny na 10% SDS-PAGE gel s gelatinem. Po rozdělení sekretovaných proteinů byl gel inkubován v renaturačním a v reaktivačním pufru a následně obarven CBB (viz kap. *Metody*, 5.12.5.). Po odbarvení se degradace gelatinu způsobená proformou a štěpenou aktivovanou MMP-2 v gelu jeví jako světlý pruh na modře obarveném pozadí. U S15F je aktivované MMP-2 méně než u SC. Nepozorovali jsme vliv CrkI na produkci ani aktivaci MMP-2 u SC ani S15F buněk. Množství produkované proformy je u všech vzorků shodné. *Obrázek představuje reprezentativní výsledek ze tří nezávislých experimentů.*

U kontrolních i inhibítorem opůsobených buněk linie S15F bylo patrné snížení aktivity MMP-2 oproti SC buňkám (viz *Obr. 6.5*). Produkce proformy MMP-2 je u stejná u SC i S15F a není ovlivněna opůsobením buněk 5 nM CrkI.

6.6. Fosforylace substrátů kinázy Src

První pozorovanou vlastností proteinu Crk byla jeho schopnost regulovat kinázovou aktivitu a přispívat ke zvýšené fosforylaci tyrozínu v buňkách (Mayer et al., 1988). Důležitým regulátorem signálních drah, do kterých je zapojen Crk, je kináza Src. Ta je zodpovědná také za fosforylaci proteinů, které se účastní integrinové signalizace. Zvýšení fosforylace substrátů kinázy Src souvisejících s integrinovou signalizací indukuje protein p130Cas, který slouží jako lešení pro tvorbu komplexů proteinů fokálních adhezí při integrinové signalizaci (Brábek et al., 2004). V buňkách S15F, ve kterých je narušena signalizace p130Cas/Crk komplexu, byl pozorován pokles fosforylace substrátů kinázy Src, mimo jiné pokles fosforylace tyrozínu 861 (Y861) kinázy FAK. Očekávali jsme, že inhibice p130Cas/Crk signalizace pomocí CrkI povede k analogickému výsledku. Proto jsme analyzovali míru fosforylace Y861FAK pomocí fosfospecifické protilátky (pY861FAK) v SC buňkách, které byly kultivovány v přítomnosti 5 nM CrkI po dobu 10 min - 18 hodin. Zatímco u S15F je patrný pokles fosforylace Y861FAK, u SC buněk opůsobených inhibítorem jsme nepozorovali obdobný efekt, kromě mírného snížení fosforylace při kultivaci SC v přítomnosti CrkI po dobu šesti hodin; tento výsledek však nebyl stabilně reprodukovatelný (viz *Obr. 6.6*). SH3N doména proteinu Crk se tedy zřejmě nepodílí spolu s p130Cas na regulaci kinázové aktivity Src.



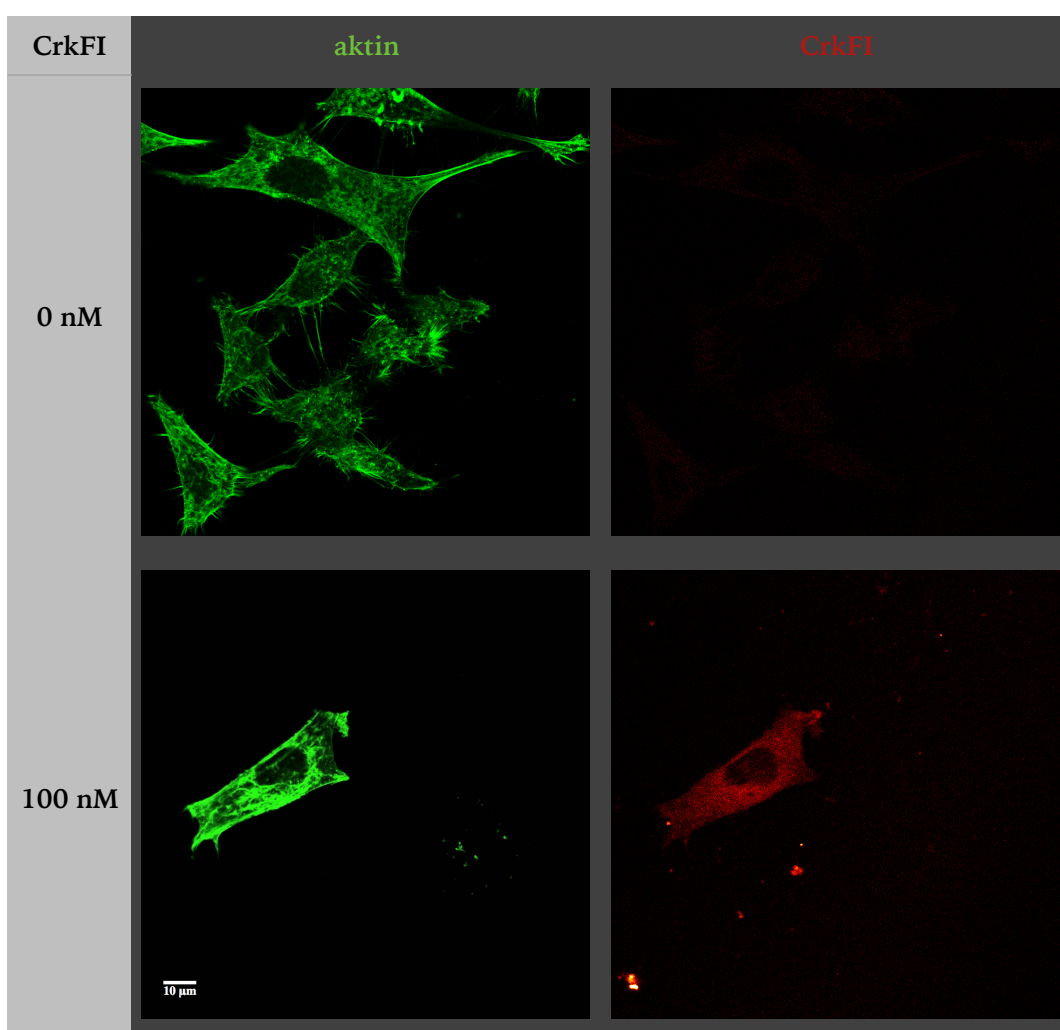
Obr. 6.6: Analýza vlivu CrkI na fosforylaci Y861 kinázy FAK. Z S15F buněk a z SC buněk kultivovaných v přítomnosti CrkI po dobu 0-18 hodin byly připraveny lyzáty a naneseny na SDS-PAGE elektroforézu. Po rozdělení byly proteiny z gelu přeneseny na nitrocelulózovou membránu a pomocí specifických protilátek bylo detekováno množství FAK fosforylované na Y861 (pY861 FAK), celkové množství FAK a aktin pro kontrolu shodné nanášky vzorků (viz kap. *Metody*, 5.7-11.). *Reprezentativní imunoblot ze tří nezávislých experimentů.*

6.7. Ověření vstupu inhibitoru CrkSH3N domény do buněk

Na základě pozorovaného efektu CrkI při buněčných analýzách jsme se rozhodli ověřit, že inhibitor vstupuje do buněk, váže se na CrkSH3N a jeho působení je specifické. Pro tyto účely jsme využili fluorescenčně značený CrkI (CrkFI; viz kapitola *Materiály*, 4.4.5.).

6.7.1. Pozorování CrkFI v buňkách

První zvolenou metodou vizualizace fluorescenčního signálu CrkFI byla konfokální mikroskopie. Sledovali jsme signál CrkFI v SC buňkách vysazených na krycích

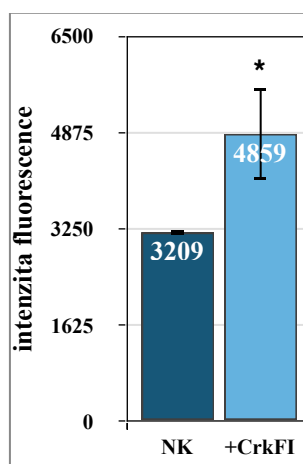


Obr. 6.7.1: Ověření vstupu CrkFI do SC buněk pomocí konfokální mikroskopie. SC buňky byly kultivovány dva dny na krycích sklíčkách pokrytých fibronectinem v médiu s CrkFI. Poté byly fixovány a barveny zeleným phalloidinem konjugovaným s AlexaFluor 488 (viz kap. *Metody* 5.6.). Horní panel ukazuje kontrolní buňky kultivované v médiu bez CrkFI, spodní panel buňky kultivované v přítomnosti 100 nM CrkFI. Zelený signál odpovídá aktinovému cytoskeletu (vlevo), v pravém panelu je zobrazen červeně signál odpovídající CrkFI. Snímky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP2 (olejový objektiv 63x/1,45). Měřítko v levém dolním rohu odpovídá délce 10 µm.

sklíčkách pokrytých fibronectinem, který stimuluje aktivaci integrinové signalizace. Ta indukuje lokalizaci Crk do blízkosti plazmatické membrány (Abassi a Vuori, 2002). Buňky byly fixovány po dvou dnech kultivace v médiu se 100 nM CrkFI, sklíčka byla pečlivě opláchnuta od přebytečného média a CrkFI a pomocí phalloidinu byl obarven také aktinový cytoskelet buněk. U buněk opůsobených 100nM CrkFI jsme pozorovali nabohacení signálu CrkFI v buňkách mimo oblast jádra, zatímco u neopůsobených buněk bylo v daném kanálu pozorováno jen slabé pozadí (viz *Obr. 6.7.1*). Signál CrkFI však byl velmi slabý a nestrukturovaný.

6.7.2. Analýza intenzity fluorescence CrkFI v buněčných lyzátech

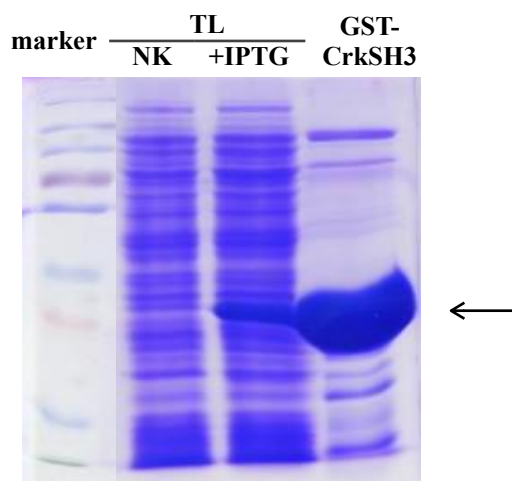
Protože nás výsledky konfokální mikroskopie jednoznačně nepřesvědčily o tom, že CrkFI skutečně vstupuje dovnitř do buněk, rozhodli jsme se potvrdit průnik CrkFI inhibitoru do buněk další nezávislou metodou. Přistoupili jsme tedy k analýze přítomnosti značeného inhibitoru v lyzátech připravených z buněk kultivovaných v přítomnosti CrkFI. Abychom se zbavili případných molekul CrkFI nespecificky navázaných na povrch cytoplazmatické membrány, byly buněčné lyzáty připraveny pomocí hypotonické lyze destilovanou vodou. Po centrifugaci lyzátu je pak na hladině supernatantu patrná frakce membránových lipidů. Cytosolickou frakci lyzátu tedy lze získat odebráním supernatantu pomocí tenké jehly tak, aby nedošlo k nabrání membránové frakce. Intenzita fluorescence takto připravených lyzáků pak byla změřena pomocí fluorometru (Tecan Infinite® 200 PRO). V lyzátech připravených z SC buněk, které byly kultivovány v přítomnosti 5 nM CrkFI, byla pozorována signifikantně vyšší intenzita fluorescence ve srovnání s lyzáty z kontrolních buněk kultivovaných bez inhibitoru (viz *Obr. 6.7.2*), což svědčí o přítomnosti fluoroforu, tedy CrkFI v lyzátech. Intenzita fluorescence lyzáků z kontrolních SC buněk byla sama o sobě poměrně vysoká. To může být i částečně způsobeno tím, že SC buňky exprimují GFP, jehož emisní spektrum se částečně překrývá s emisním spektrem TAMRA fluoroforu, kterým je označen CrkFI.



Obr. 6.7.2: Měření intenzity fluorescence v buněčných lyzátech. Lyzáty byly připraveny hypotonickou lyzí (viz *kap. Metody 5.7.*) SC buněk kultivovaných v přítomnosti 5 nM CrkFI (+CrkFI, světle modrý sloupec) nebo kontrolních SC bez CrkFI (NK, tmavě modrý sloupec). Intenzita fluorescence byla měřena při nastavené excitační vlnové délce 536 nm a emisní vlnové délce 572 nm na fluorometru Tecan Infinite® 200 PRO. Jako blank byla použita miliporová H₂O, ve které byly buňky lyzovány. Nárůst intenzity fluorescence u lyzátů z buněk opůsobených inhibitorem svědčí o vstupu CrkFI do buněk. *Data pocházejí ze tří nezávislých experimentů; chybové úsečky značí směrodatnou odchylku, * statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).*

6.8. Analýza vazebných vlastností inhibitoru CrkSH3N

Fluorescenčně značený inhibitor jsme dále využili pro *in vitro* analýzu vazby na GST-fúzní CrkSH3N doménu. Za tímto účelem byl připraven pGEX-CrkSH3 vektor vložením fragmentu DNA kódujícím lidskou CrkSH3N, který byl vyštěpen z vektoru Crk-SH3_pMA-T (komerčně syntetizovaný: GeneArt®, Life Technologies), do vektoru pGEX2T přes EcoRI a BamHI restrikční místa. Po indukci buněk *E. coli* nesoucích tento konstrukt pomocí IPTG dojde k expresi fúzního proteinu CrkSH3N s GST (glutathion-S-transferáza) značkou na N-konci. GST-fúzní CrkSH3N doména byla purifikována z bakteriálního lyzátu pomocí glutathionu kotveného na agarózové matici (viz *Obr. 6.8*). Po uvolnění z agarózové matrice byla CrkSH3N využita v experimentech pro ověření selektivity vazby CrkFI a stanovení hodnoty IC₅₀. Schopnost vazby CrkFI na CrkSH3N doménu byla porovnávána s jeho schopností vázat SH3 doménu proteinu Src. Vektor pro expresi GST-fúzní SrcSH3 byl v naší laboratoři připraven již dříve. Pro kontrolu případné nespecifické vazby CrkFI byla do experimentů zařazena také samotná GST, připravená bakteriální expresí prázdného pGEX vektoru.

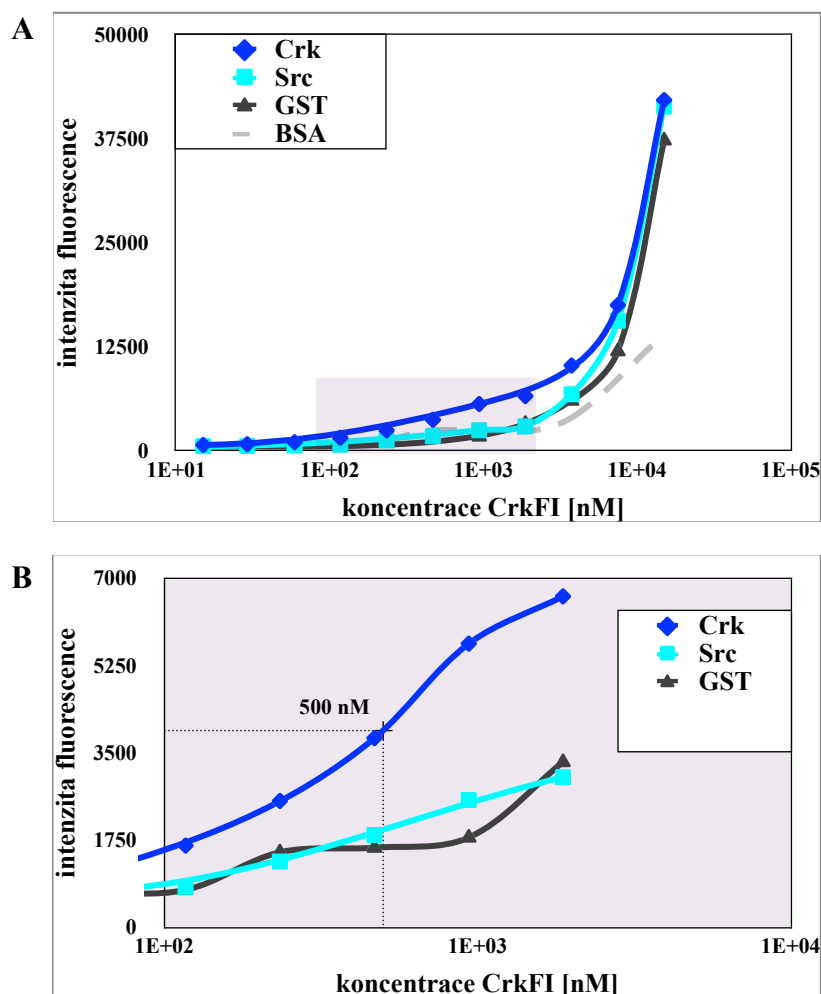


Obr. 6.8: Příprava GST-fúzní CrkSH3N domény. Expresce GST-fúzní CrkSH3N domény je indukována přidáním IPTG k bakteriální kultuře. Po indukci exprese (*TL +IPTG*) dochází k nárustu proteinu ve velikosti odpovídající GST-CrkSH3N (*naznačeno šipkou*) oproti bakteriálnímu lyzátu před indukci exprese (*TL NK*). GST-fúzní SH3 doména (*GST-CrkSH3*) je z bakteriálního lyzátu purifikována pomocí GSH Sepharosy (viz kap. *Metody*, 5.2.)

6.8.1. Ověření selektivity vazby CrkFI na CrkSH3N doménu

Schopnost CrkFI vázat CrkSH3N doménu jsme ověřili pomocí ELISA testu. K GST-CrkSH3N doméně imobilizované hydrofobní reakcí na dně jamek 96-jamkové destičky jsme titrovali ředící řadou CrkFI a množství navázaného CrkFI jsme analyzovali měřením intenzity fluorescence (viz kapitola *Metody*, 5.3.). Pro ověření selektivity vazby CrkFI jsme analyzovali také vazbu CrkFI k SH3 doméně proteinu Src (viz *Obr. 6.8.1A*). Pozorovali jsme, že s rostoucí koncentrací přidaného CrkFI roste intenzita fluorescence v jamkách s imobilizovanou CrkSH3N. Signál z jamek s imobilizovanou GST-fúzní SH3 doménou proteinu Src byl srovnatelný se signálem z kontrolních jamek obsahujících imobilizovanou GST (viz *Obr. 6.8.1B*) a z prázdných jamek blokových BSA. Z toho vyplývá, že CrkFI se neváže specificky na SrcSH3 doménu. Pozorovali jsme však nespecifickou vazbu CrkFI na GST i BSA, která po překročení určité koncentrace (cca 5000 nM) prudce stoupá (viz *Obr. 6.8.1A*).

Prokázali jsme tedy, že inhibitor je schopen vázat se na SH3N doménu proteinu Crk a že tato vazba je v rámci testovaných SH3 domén selektivní.



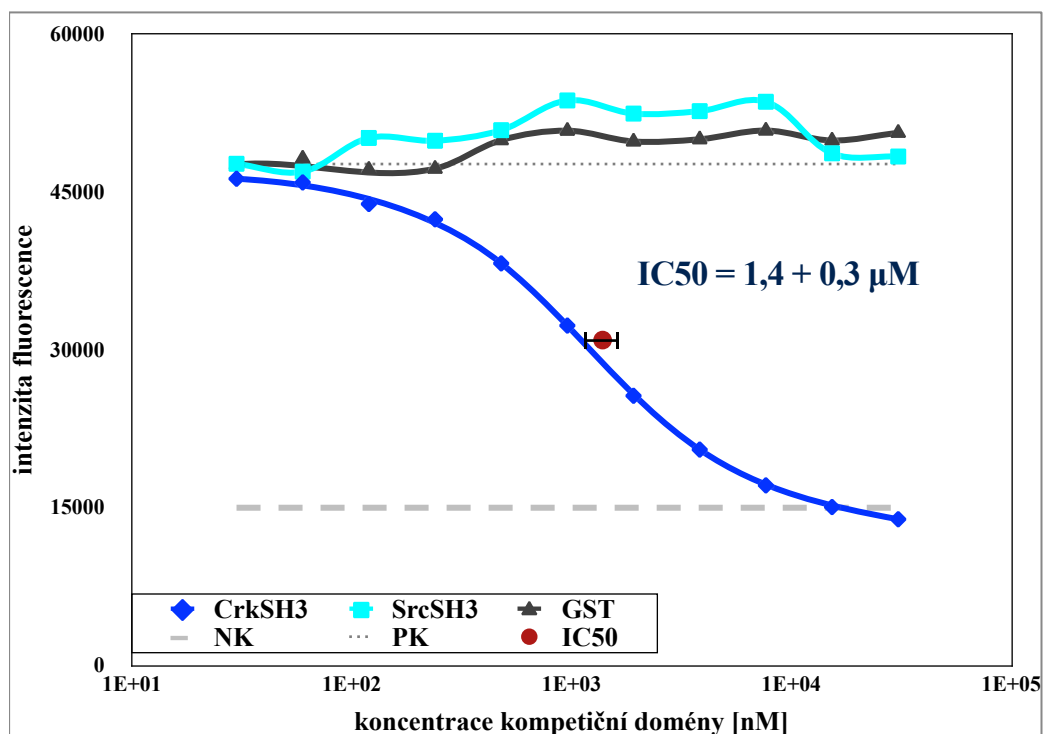
Obr. 6.8.1 Analýza vazby CrkFI k SH3 doménám proteinů Crk a Src. V jamkách 96-jamkové destičky Corning byly imobilizovány GST-fúzní domény proteinů Crk (*tmavě modrá*) a Src (*světle modrá*) a samotná GST (*tmavě šedá*). Pro kontrolu nespecifické vazby byl změřen i signál z jamek, které neobsahovaly žádnou imobilizovanou doménu, ale byly pouze blokovány pomocí BSA (*BSA, světle šedá*). Do jamek byla přidána ředící řada CrkFI a po odmytí nenavázaného CrkFI bylo analyzováno množství navázaného CrkFI měřením intenzity fluorescence (viz kap. *Metody*, 5.3.). Z reprezentativního grafu (A) je patrné, že CrkFI se váže specificky na CrkSH3N a nikoliv na SrcSH3. S rostoucí koncentrací CrkFI prudce stoupá nespecifická vazba CrkFI. Fialový obdélník v grafu A vyznačuje oblast specifické vazby, která je pro větší názornost zvětšena na grafu B. Na grafu B je přerušovanou čarou vyznačena přibližná hodnota koncentrace CrkFI dostačující k saturaci 50 % CrkSH3N domény (500 nM). S touto koncentrací jsme pracovali při stanovování hodnoty IC₅₀. Graf představuje reprezentativní výsledek ze tří nezávislých experimentů.

6.8.2. Stanovení hodnoty IC₅₀

Abychom kvantifikovali afinitu vazby inhibitoru na CrkSH3N, stanovili jsme jeho hodnotu IC₅₀ („*half maximal inhibitory concentration*“). IC₅₀ vyjadřuje takovou koncentraci látky, která je schopná *in vitro* inhibovat zkoumaný jev z 50%. Hodnota IC₅₀ kompetitivního inhibitoru se za určitých podmínek může blížit hodnotě K_D (Patil et al., 1996). V naší laboratoři byla již zavedena metoda pro stanovení IC₅₀ pomocí kompetiční vazebné analýzy (Gemperle, diplomová práce 2012). Při této metodě je

testována vazba inhibitoru na imobilizovanou GST-fúzní SH3 doménu v přítomnosti zvyšující se koncentrace solubilní GST-fúzní SH3 domény, která s imobilizovanou doménou kompetuje o vazbu inhibitoru. Hodnota IC_{50} pak odpovídá takové koncentraci kompetiční domény, která je dostačující pro vyvážení právě 50% inhibitoru. Výchozí používaná koncentrace inhibitoru by měla odpovídat koncentraci, při které je saturováno přibližně 50 % imobilizovaných GST-SH3 domén. Na základě předchozího experimentu jsme používali CrkFI v koncentraci 500 nM (viz *Obr. 6.8.1B*).

Hodnotu IC_{50} fluorescenčně značeného inhibitoru CrkSH3N domény jsme stanovili jako $1,4 \pm 0,3 \mu M$. Ověřili jsme také, že solubilní GST-fúzní SH3 doména proteinu Src není schopná kompetovat s imobilizovanou GST-fúzní CrkSH3N o vazbu CrkFI (viz *Obr. 6.8.2*).



Obr. 6.8.2: Stanovení hodnoty IC_{50} . Na dně jamek 96-jamkové destičky Corning byla imobilizována GST-fúzní CrkSH3N doména (50 $\mu g/ml$), ke které jsme přidali ředící řadu kompetiční GST-fúzní CrkSH3N, SrcSH3, nebo samotné GST, a 500 nM CrkFI. Množství CrkFI navázaného na imobilizované CrkSH3N jsme analyzovali měřením intenzity fluorescence (viz kap. *Metody*, 5.4.). Tečkovaná čára (PK) v grafu vyznačuje hodnotu signálu z jamek s imobilizovanou CrkSH3N a 500nM CrkFI bez přidání kompetiční domény (tzn. signál 100% navázaného CrkFI); přerušovaná čára (NK) naopak představuje signál z jamek s imobilizovanou GST místo CrkSH3N domény (tzn. 0% specificky vázaného CrkFI). S rostoucí koncentrací kompetiční CrkSH3N klesá vazba CrkFI na imobilizovanou doménu (tmavě modrá křivka). SrcSH3 není schopná s imobilizovanou CrkSH3N kompetovat o vazbu CrkFI (světle modrá křivka), obdobně jako kontrolní samotná GST (tmavě šedá křivka). Do reprezentativního grafu byla přidána průměrná hodnota IC_{50} (červený bod), stanovená na základě 3 nezávislých experimentů. Chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku hodnoty IC_{50} .

7. DISKUZE

Protoonkogen Crk je spojován s nádory pokročilých stádií s vysoce metastatickým potenciálem (shrnutí v Tsuda a Tanaka, 2012; Sriram a Birge, 2010; Kumar et al., 2014). Strukturu adaptorového proteinu Crk tvoří vazebné domény SH2 a SH3, díky kterým Crk v signálních drahách plní úlohu proteinového „lešení“, které umožňuje interakce proteinů, vznik signálních komplexů a přenos signálu. Crk integruje signál přicházející od proteinů vázajících jeho SH2 doménu a N-terminální CrkSH3 doména je pak zodpovědná za přenos signálu a aktivaci dalších efektorů (Mayer a Hanafusa, 1990; Matsuda et al., 1991; Reichman et al., 1992; shrnutí v Feller et al., 1994; Birge et al., 1996; Feller et al., 1998). Cílem této diplomové práce bylo analyzovat vliv inhibice N-terminální SH3 domény proteinu Crk na invazivní vlastnosti buněk.

7.1. Inhibice CrkSH3N domény snižuje invazivní potenciál buněk a jejich schopnost růst nezávisle na podkladu

Řada studií prokázala ústřední úlohu proteinu Crk v regulaci buněčného pohybu a jeho důležitou roli v signálních drahách, které jsou zodpovědné za zvýšený invazivní potenciál nádorových buněk (Cho a Klemke, 2000; Takino et al., 2003; Tsuda et al., 2004; Rodrigues et al., 2005; Hasegawa et al., 2009; Dai et al., 2011; Yamada et al., 2013 a další; shrnutí v Tsuda a Tanaka, 2012). Výsledky této diplomové práce ukazují, že kompetitivní inhibice vazby buněčných ligandů CrkSH3N domény pomocí vysokoafinního peptoidu vede ke snížené invazivitě buněk. Pro inhibici invazivity ve 3D kolagenu se ukázalo být optimální opusobení buněk inhibitorem CrkSH3N domény (CrkI) v 5nM koncentraci (viz Obr. 6.1A). Vyšší koncentrace CrkI překvapivě vede ke snížení inhibičního efektu. Jedním z možných důvodů tohoto jevu by mohlo být nespecifické působení CrkI. Buněčné proteiny obsahují velké množství SH3 domén, jejichž ligandy často vykazují značnou promiskuitu a interagují s SH3 doménami několika různých proteinů. Přestože námi používaný inhibitor váže CrkSH3N doménu s mnohonásobně vyšší afinitou než SH3 domény jiných proteinů (Nguyen et al., 2000), jeho interakce s jinými buněčnými SH3 doménami není vyloučena. Výsledky *in vitro* vazebných experimentů s fluorescenčně značeným inhibitorem (CrkFI) prokázaly

selektivní vazbu inhibitoru na CrkSH3N doménu oproti SH3 doméně proteinu Src (viz kapitola 6.8, *Obr. 6.8.1-2*). Pro vyloučení nespecifického působení CrkI v buňkách by však bylo nutné otestovat jeho vazbu na rozsáhlejší panel buněčných SH3 domén. Snižující se inhibiční efekt CrkI ve vyšších koncentracích by se dal vysvětlit i jiným způsobem: protein Crk může zaujímat různé strukturní konformace - aktivní konformace je v buňkách v rovnováze s neaktivní sbalenou formou proteinu, u které je vlivem intramolekulárních interakcí blokován vazebný povrch SH2 domény (Kobashigawa et al., 2007; Jankowski et al., 2012). SH2 doména je zodpovědná za interakci s proteiny fosforylovanými na tyrozínech a zprostředkovává tak lokalizaci Crk spolu s jeho SH3N ligandy do blízkosti membrány, kde následně aktivují další efekторы. Sbalená forma Crk se zablokovanou SH2 doménou tedy neumožňuje interakci s CrkSH2 ligandy a tvorbu signálního komplexu, který je nezbytný pro přenos signálu. V neaktivní sbalené konformaci však nemusí být blokována CrkSH3N doména a neaktivní Crk tedy může být v komplexu s proteiny vázajícími SH3N doménu (např. C3G, Dock180, Sos) a vyvazovat je tak ze signálních drah (Sriram et al., 2014; Jankowski et al., 2012). CrkI ve vyšší koncentraci by tedy mohl uvolnit větší množství těchto ligandů z komplexu s neaktivním Crk. Ty by pak byly k dispozici pro vazbu jiných adaptorových proteinů obsahujících SH3 domény (např. Nck, Grb2, p130Cas) a mohly by se zapojit do signálních drah nezávisle na Crk a aktivovat další efekторы přispívající k invazivitě buněk.

Jako pozitivní kontrolu působení CrkI na invazivitu SC buněk jsme do experimentu zařadili také S15F buňky, které oproti linii SC vykazují výrazně sníženou invazivitu v důsledku mutace v substrátové doméně (SD) proteinu p130Cas. Ta neumožňuje tvorbu komplexu p130Cas/Crk a blokuje tak přenos signálu přes Crk (Brábek et al., 2005), analogicky jako CrkI inhibicí CrkSH3N domény blokuje přenos signálu z p130Cas/Crk komplexu na další efekторы. Inhibice CrkSH3N domény vede ke snížení invazivity SC buněk, ale v menší míře než mutace SD p130Cas S15F buněk (viz *Obr. 6.1.B*). To lze vysvětlit tím, že mutace SD p130Cas znemožňuje kromě vazby Crk také vazbu dalších proteinů obsahujících SH2 doménu. K takovým buněčným ligandům fosforylované SD p130Cas patří například adaptorový protein Nck, kináza Abl, fosfatáza SHP-2 nebo proteiny rodiny Zyxin (shrnutí v Tikhmyanova et al., 2009).

Nck patří stejně jako Crk do rodiny adaptorových proteinů obsahujících pouze SH domény a bylo ukázáno, že se spolu s p130Cas také podílí na regulaci aktinového cytoskeletu a že deplece Nck vede ke snížení migrace buněk (Rivera et al., 2006). Podobně i proteiny rodiny Zyxin se podílí na regulaci buněčného pohybu a navíc mohou indukovat expresi matrixových metaloproteáz (Pratt et al., 2005, Nakamoto et al., 2000). V případě nespecifické vazby by CrkI teoreticky mohl ovlivňovat signalizaci proteinů Nck a Abl, které také obsahují SH3 domény. Nicméně interakce CrkI s SH3 doménami těchto proteinů není příliš pravděpodobná, protože vazebný motiv preferovaný těmito SH3 doménami je odlišný a bylo ukázáno, že ani Abl ani Nck neváží peptid, od jehož sekvence je odvozen CrkI peptoid (Posern et al., 1998).

Invazivita souvisí s migrací buněk a jejich schopností remodelovat extracelulární matrix. Test „*wound healing*“ (hojení rány) ukázal, že CrkI v 5nM koncentraci, při které inhibuje invazivitu ve 3D kolagenu, neovlivňuje migraci buněk ve 2D prostředí (viz Obr. 6.3.1-2). Tyto výsledky ukazují, že pozorovaný inhibiční efekt CrkI je specifický pro invazivitu buněk ve 3D prostředí a není způsoben vlivem na migraci obecně. Řada studií ukázala, že deplece nebo dominantně negativní mutace Crk vede k narušení migrace u různých typů nádorových buněk (Rodrigues et al., 2005; Dai et al., 2011; Yamada et al., 2011; Pezeshkpour et al., 2013). Antoku et al. (2009) analyzovali vliv deplece jednotlivých izoform CrkII a CrkL na bazální a PDGF indukovanou migraci buněk. Jejich výsledky ukazují, že deplece pouze jedné z izoform vede ke snížení PDGF indukované migrace, ale neovlivňuje bazální migraci buněk. Teprve současná deplece obou izoform blokuje bazální i PDGF indukovanou migraci. Pro udržení bazální migrace buněk tedy patrně stačí i malé množství Crk. CrkI v námi používané koncentraci pravděpodobně inhibuje jen část Crk molekul, jejíž příspěvek k buněčné migraci může být dostatečně zastoupen neinhibovaným Crk.

Mutace tyrozínových motivů SD p130Cas znemožňující tvorbu p130Cas/Crk komplexu vede ke snížení migrace indukované fibronectinem (Shin et al., 2004; Meenderink et al., 2010). Námi provedený test migrace ale neukázal signifikantní pokles migrace S15F buněk oproti SC buňkám (viz Obr. 6.3.2). Tento nesoulad však může být dán tím, že ve zmíněných pracích byla pozorována migrace myších

embryonálních fibroblastů indukovaná fibronectinem, zatímco my jsme sledovali bazální migraci buněk, navíc v kontextu transformace aktivním Src.

Výchozím předpokladem invazivity buněk a vzniku metastáz je schopnost nádorových buněk remodelovat a degradovat extracelulární matrix v okolí primárního nádoru (Liotta et al., 1980). Jedním z buněčných nástrojů remodelace extracelulární matrix jsou matrixové metaloproteázy (MMPs). Exprese MMPs je řízena transkripčním faktorem AP-1, jehož aktivitu může skrz JNK signalizaci regulovat i Crk (Hasegawa et al., 2009). Vliv Crk na expresi MMPs potvrdilo několik studií ukazujících stimulaci exprese MMPs v buňkách transformovaných v-Crk a snížení jejich exprese v důsledku deplece Crk (Garcia-Guzman et al., 1999; Liu et al., 2000; Hasegawa et al., 2009; Lv et al., 2013). Jedním ze způsobů, jak by CrkI mohl ovlivňovat invazivitu buněk, by tedy mohla být regulace MMPs a degradace extracelulární matrix. V souladu s předchozími experimenty poukazujícími na roli p130Cas a fosforylace jeho substrátové domény v aktivaci metaloproteázy MMP-2 u buněk transformovaných Src (Brábek et al., 2004; Brábek et al., 2005) ukázaly výsledky gelatinové zymografie sníženou aktivaci MMP-2 u S15F buněk oproti SC buňkám. Nepozorovali jsme ale žádný vliv inhibice CrkSH3N domény na aktivaci MMP-2. Jak již bylo zmíněno, mutace SD p130Cas u S15F buněk ovlivňuje i signalizaci nezávislou na Crk a za pozorovaný pokles aktivity MMP-2 u S15F mohou tedy být kromě Crk zodpovědné také jiné ligandy SD p130Cas. Nedávno bylo zjištěno, že pro produkci a aktivaci MMP-2 je nezbytný protein C3G, aktivátor GTPázy Rap1, který patří k hlavním ligandům CrkSH3N (Che et al., 2015). Vliv Crk na MMPs je tedy zřejmě zprostředkován především tímto proteinem a regulací MAPK signalizace v důsledku aktivace Rap1. C3G obsahuje čtyři vazebné motivy CrkSH3N domény (Knudsen et al., 1994) a v porovnání s ostatními ligandy váže CrkSH3N s nejvyšší afinitou. Na to poukázaly také vazebné experimenty s vysokoafinními peptidy vázajícími CrkSH3N (*HACBP*, viz kapitola 3.5.2.), od kterých je odvozena sekvence námi používaného kompetitivního peptoidu CrkI. Vazba C3G na CrkSH3 je v přítomnosti *HACBP* snížena v menší míře než vazba proteinů Dock180 a Sos, kterou *HACBP* dokáže zcela zablokovat (Posern et al., 1998). Je tedy pravděpodobné, že CrkI v používané 5nM koncentraci není schopen kompetovat s C3G o vazbu CrkSH3N tak účinně, jako s ostatními jejími ligandy. Kromě MMP-2 se na remodelaci

extracelulární matrix mohou podílet i další sekretované a membránové proteolytické enzymy, které nejsou detekovatelné pomocí gelatinové zymografie. Invazivní potenciál buněk navíc není určen jen množstvím sekretovaných metaloproteáz, klíčovou roli hraje především stabilita invadopodií, výběžků cytoplazmatické membrány, které jsou bohaté na aktin a vykazují vysokou míru proteolytické aktivity (shrnutí v Buccione et al., 2009). Bylo by tedy vhodné dále otestovat vliv inhibice CrkSH3 domény souhrnně na dynamiku invadopodií a degradaci extracelulární matrix, například pomocí fluorescenční mikroskopie invadopodií spojené s analýzou degradace fluorescenčně značeného gelatinu (popsáno v Janostiak et al., 2011).

Pro tvorbu invadopodií a degradaci extracelulární matrix je nezbytná kináza Src (Chen et al., 1989). Aktivitu kinázy Src může regulovat adaptorový protein p130Cas, který pomocí svých vazebných domén umožňuje interakci Src a jejích substrátů. Kromě několikrát zmiňované substrátové domény, která je zodpovědná za vazbu Crk, obsahuje p130Cas také doménu vázající Src a SH3 doménu, dále pak doménu bohatou na serin a C-terminální doménu (shrnutí v Tikhmyanova et al., 2009). K ligandům SH3 domény p130Cas patří také další kináza související s integrinovou signalizací a regulací buněčného pohybu FAK, která obsahuje několik regulačních tyrozinů, které jsou fosforylovány kinázou Src (Polte a Hanks, 1995; Calalb et al., 1995). Protein p130Cas přispívá k fosforylaci FAK kinázou Src, přičemž v tomto procesu se ukázaly hrát podstatnou roli tyrozinové motivy jeho substrátové domény: u S15F buněk byla pozorována nižší hladina fosforylace FAK (Brábek et al., 2004; Brábek et al., 2005). Tato skutečnost naznačuje, že v transaktivaci Src by v komplexu s p130Cas mohl mít úlohu i Crk a jeho efekторы. Nasvědčují tomu i práce, které poukázaly na zvýšenou fosforylaci FAK v buňkách transformovaných v-Crk nebo exprimujících ektopický Crk-II (Akagi et al., 2002; Iwahara et al., 2004). Crk také přispívá k fosforylaci adaptorového proteinu Gab1, za kterou je taktéž zodpovědná kináza Src (Watanabe et al., 2009). Abychom ověřili možnost, že CrkI ovlivňuje invazivitu buněk skrz modulaci aktivity kinázy Src, analyzovali jsme fosforylaci tyrozinu 861 kinázy FAK (Y861FAK). Nepozorovali jsme ale, že by inhibice CrkSH3N vedla ke snížení hladiny fosforylace FAK. Je možné, že se SH3N doména proteinu Crk na zprostředkování

p130Cas indukované aktivace Src nepodílí. Nedávný model Srirama et al. (2014) například připisuje úlohu v regulaci Src kináz C-terminální SH3 doméně proteinu Crk.

Kromě vlivu inhibice CrkSH3N domény na invazivitu buněk jsme pozorovali také inhibiční efekt CrkI na schopnost buněk transformovaných Src růst nezávisle na podkladu. Tato vlastnost je typická pro transformované buňky, u netransformovaných buněk vyvolává ztráta přichycení k podkladu buněčnou smrt. Schopnost buněk vytvářet kolonie v neadhezivním prostředí souvisí s proliferační aktivitou buněk a jejich rezistencí k apoptóze a testuje se jako jedno z měřítek nádorové transformace buněk. Schopnost vyhnout se apoptóze také napomáhá transformovaným buňkám přežívat v nepůvodních tkáních a přispívá tak k jejich metastatickému potenciálu. Pozorovali jsme, že CrkI snižuje schopnost SC buněk vytvářet velké kolonie v měkkém agaru v průměru o polovinu. Mayer a Hanafusa (1990) zjistili, že mutace v SH3 doméně onkogenu *v-crk* vede k značnému oslabení jeho transformační aktivity. Negativní vliv deplece Crk na schopnost růst nezávisle na podkladu byl pozorován u různých typů nádorových buněk (Linghu et al., 2006; Wang et al., 2007; Wang et al., 2011; Fathers et al., 2012; Lv et al., 2013). Vliv CrkI byl patrný především u středních a velkých kolonií, nepozorovali jsme signifikantní rozdíl v počtu malých kolonií. Podobný výsledek pozorovali i Linghu et al. (2006), kdy deplece Crk pomocí siRNA vedla k poklesu počtu středních a velkých kolonií, ale počet malých kolonií se naopak zvýšil. Vysoce invazivní nádorové buňky pankreatu exprimující ektopický Crk tvoří větší kolonie v měkkém agaru, přestože jejich proliferace v prostředí, které umožňuje přichycení k podkladu, je stejná jako u kontrolních buněk (Kain et al., 2003). Ani my jsme nepozorovali vliv CrkI na proliferaci SC buněk přichycených k podkladu (viz kapitola 6.2., *Obr. 6.2C*). Tyto výsledky naznačují, že Crk reguluje spíše přežívání buněk než jejich proliferaci. Možnost inhibovat schopnost buněk transformovaných Src růst nezávisle na podkladu pomocí inhibice CrkSH3N domény také dokazuje, že Crk se podílí na zprostředkování transformační aktivity onkogenní kinázy Src. Nedávná práce Koptiry et al. (2015) ukazuje, že Crk je nezbytný také pro transformaci buněk vyvolanou onkogeny *v-fos* a *v-ras*. U S15F buněk jsme podle předpokladu pozorovali sníženou schopnost tvořit velké kolonie v porovnání s SC, i když efekt mutace v SD p130Cas na schopnost buněk růst nezávisle na podkladu je menší než efekt CrkI (viz *Obr. 6.4*). To by se dalo vysvětlit

tím, že Crk se zapojuje i do dalších signálních drah nezávislých na p130Cas. K dalším SH2 ligandům proteinu Crk patří například Gab1 (adaptorový protein fosforylovaný na tyrozínech v závislosti na aktivaci c-Met receptoru) nebo receptory růstových faktorů (shrnutí v Feller et al., 1998). Zatímco mutace SD p130Cas u S15F ovlivňuje primárně integrinovou signalizaci, inhibice CrkSH3N může blokovat i jiné signální dráhy, které mohou hrát v regulaci přežívání buněk významnější roli. Překvapivě jsme ale zjistili, že u S15F buněk indukuje CrkI tvorbu velkých kolonií, což pravděpodobně poukazuje na určité nespecifické působení inhibitoru.

7.2. Vlastnosti kompetitivního inhibitoru CrkSH3N

V dalších experimentech jsme se zaměřili na analýzu vlastností námi používaného inhibitoru CrkSH3N domény. V první řadě jsme ověřili, že CrkI nepůsobí cytotoxicky a pozorovaný inhibiční efekt na invazivitu a na schopnost růst nezávisle na podkladu není způsoben rozdílnou proliferací kontrolních a inhibitorem ošetřených buněk. Sekvence CrkI peptoidu je odvozena od vazebné sekvence proteinu C3G, tato sekvence se tedy běžně vyskytuje v buňkách, a proto by neměla být toxická, neboť v opačném případě by už byla přirozeným selekčním tlakem eliminována (Posern et al., 1998). To potvrzuje i studie Kardinala et al. (2000), kteří blokovali tvorbu komplexu Bcr-Abl/CrkL v buňkách chronické myeloidní leukemie (CML) pomocí *HACBP*s (vysokoafinních ligandů CrkSH3N odvozených od vazebného motivu C3G). Přestože *HACBP*s inhibovaly proliferaci CML buněk, nevykazovaly cytotoxický účinek - nevyvolávaly u buněk apoptózu a po degradaci *HACBP*s se proliferace buněk obnovila.

Problémem peptidových inhibitorů bývá špatná prostupnost skrz cytoplazmatickou membránu. Aby zajistili efektivnější vstupování do buněk, Kardinal et al. ve zmíněné studii opatřili *HACBP*s krátkými penetračními peptidy, které usnadňují pronikání membránou („*cell penetrating peptides*“; CPPs). V námi používaném inhibitoru je jeden z prolinů jádra vazebného motivu nahrazen N-substituovaným zbytkem, nejedná se tedy o peptid, ale peptoid. Peptoidová modifikace může usnadňovat průnik cytoplazmatickou membránou (Huang et al., 1998). Jádro vazebného motivu CrkI je navíc na C-konci rámováno sekvencí bohatou na argininy, které jsou zodpovědné za vysokou afinitu a specifitu vazby na CrkSH3N (Posern et al., 1998; sekvence CrkI je

YPP x ALPPKRRR, kde x je N-substituovaný zbytek: N-(S)-fenylethyl). Bazické peptidy bohaté na arginin obecně snadno prostupují membránou a patří k nejčastěji používaným penetračním peptidům² (Vives et al., 1997; shrnuto v Schmidt et al., 2010). Díky zmíněným vlastnostem CrkI dokáže sám o sobě vstupovat do buněk, což jsme ověřili s použitím fluorescenčně značeného inhibitoru (CrkFI) pomocí konfokální mikroskopie a analýzou přítomnosti CrkFI v buněčných lyzátech (viz kapitola 6.7.).

CrkFI jsme dále využili pro *in vitro* vazebné a kompetiční analýzy. Ověřili jsme, že inhibitor se specificky váže na imobilizovanou GST-fúzní CrkSH3N doménu a zároveň že je tato vazba selektivní oproti SH3 doméně kinázy Src. To je v souladu s výsledky Nguyena et al. (2000), kteří naměřili téměř 6000x vyšší afinitu vazby CrkI k CrkSH3N než k SrcSH3. Abychom kvantifikovali afinitu vazby inhibitoru na CrkSH3N, stanovili jsme hodnotu IC₅₀ pomocí kompetiční vazebné analýzy. Hodnota IC₅₀ může přibližně odpovídat hodnotě K_D, obě tyto hodnoty jsou však do jisté míry závislé na konkrétních experimentálních podmínkách, za kterých jsou stanoveny. Námi určená hodnota IC₅₀ 1,4 ± 0,3 μM vypovídá o silné vazbě CrkFI na CrkSH3N (K_D buněčných ligandů SH3 domén se obvykle pohybuje v rozmezí 5-100 μM), nicméně je výrazně vyšší než K_D vazby CrkI peptoidu na CrkSH3N naměřené Nguyenem et al. (2000). Ti stanovili hodnotu K_D jako 0,008 μM metodou měření fluorescence tryptofanů (při vazbě peptidu na SH3 dochází k interakci s tryptofany vazebného místa domény, která se projevuje jako perturbace fluorescence). Sekvence peptoidu CrkI je odvozena od proteinu C3G. Peptid odpovídající vazebnému motivu C3G (PPPALPPKK) váže Crk s K_D 1,89 μM (Knudsen et al., 1995). Mutagenezí tohoto peptidu byla získána sekvence PPPALPPKRRR, která váže CrkSH3N s výrazně vyšší afinitou (K_D = 0,110 μM; Posern et al., 1998). Tato sekvence byla využita pro navržení CrkI peptoidu, Nguyen et al. ale naměřili K_D vazby tohoto peptidu na CrkSH3N jako 0,02 μM (za použití stejné metody jako Posern et al.). Peptoidová modifikace CrkI pak vedla k dalšímu zvýšení afinity (K_D = 0,008 μM). Odlišnost námi stanovené hodnoty IC₅₀ od této hodnoty může být tedy způsobena použitím jiné

²„cell-penetrating peptides“ (CPPs; „schuffle tags“) jsou krátké peptidy, které se používají pro zprostředkování vstupu do buněk u biologicky aktivních látek, které samy skrz membránu nepronikají. Typickým penetračním peptidem je TAT, peptid odvozený od TAT proteinu HIV. TAT obsahuje šest argininů a dva lysiny, které peptidu udělují pozitivní náboj nezbytný pro průnik cytoplazmatické membrány (shrnutí v Schmidt et al., 2010).

experimentální metody a rozdílnými podmínkami - Nguyen et al. například pracovali s myší CrkSH3N, zatímco my s lidskou. Především jsme však pro stanovení IC50 používali fluorescenčně značený peptoid (CrkFI), přičemž fluorescenční značka připojená k peptoidu bezpochyby interaguje s CrkSH3N doménou a ovlivňuje afinitu vazby.

7.3. Další směřování projektu

Výsledky této diplomové práce podávají důkaz o relevanci cílení N-terminální domény proteinu Crk pomocí kompetitivního peptoidu za účelem inhibice invazivity nádorových buněk. Další výzkum by měl směřovat k objasnění mechanismu, kterým je invazivita ve 3D prostředí pomocí CrkI inhibována. Zjistili jsme, že CrkI nemá vliv na proliferaci buněk a migraci ve 2D prostředí, na aktivaci MMP-2 a nepozorovali jsme vliv na aktivaci Src. Jak již bylo zmíněno, bylo by vhodné dále analyzovat vliv CrkI na stabilitu invadopodií a degradaci extracelulární matrix. Crk a jeho regulace pomocí kinázy Abl, která patří k CrkSH3N ligandům, hraje roli v regulaci fokálních adhezí (Antoku et al., 2009, Park et al., 2014). CrkI by tedy mohl ovlivňovat také dynamiku fokálních adhezí. Dalším možným přístupem, jak potvrdit mechanismus fungování inhibitoru, je analýza aktivity efektorů, které jsou regulovány signalizací proteinu Crk - tedy malých GTPáz Rac1, Rap1 nebo RhoA, nebo stresových kináz JNK či ERK. Dále by bylo vhodné ověřit specifitu působení CrkI, například identifikací proteinů, na které se CrkI v buňkách váže, pomocí hmotnostní spektrometrie. Poté by se dalo přistoupit k testování vlivu inhibice CrkSH3N v *in vivo* modelech.

8. SHRNOTÍ

Tato práce se zabývala analýzou vlivu inhibice N-terminální domény proteinu Crk na invazivní vlastnosti buněk.

- Zjistili jsme, že inhibice CrkSH3N pomocí kompetitivního peptoidu v nanomolární koncentraci vede ke snížení invazivity ve 3D kolagenu u myších embryonálních fibroblastů transformovaných aktivním Src a u lidských nádorových buněk prsu linie MDA-MB-231. Zároveň se ukázalo, že při zvýšení koncentrace inhibitoru se inhibiční efekt zeslabuje.
- Ověřili jsme, že pozorovaný efekt inhibitoru na buněčnou invazivitu není způsoben jeho případným cytotoxickým efektem. Ošetření buněk inhibitorem nemělo vliv na jejich proliferaci.
- Ukázalo se, že inhibitor v koncentraci, při které snižuje specificky invazivitu buněk ve 3D prostředí, nemá vliv na migraci buněk ve 2D prostředí.
- Nepodařilo se prokázat, že by inhibice CrkSH3N měla vliv na produkci nebo aktivaci metaloproteázy MMP-2. Nepodařilo se potvrdit ani očekávaný vliv inhibitoru na fosforylaci substrátů kinázy Src souvisejících s integrinovou signalizací.
- Zjistili jsme, že inhibitor CrkSH3N má potenciál inhibovat schopnost buněk růst nezávisle na podkladu.
- S využitím fluorescenčně značené varianty inhibitoru jsme prokázali jeho schopnost prostupovat cytoplazmatickou membránou a vstupovat do buněk.
- Dále jsme *in vitro* ověřili, že dochází k vazbě inhibitoru na imobilizovanou CrkSH3N doménu a že tato vazba je specifická a inhibitor se neváže na kontrolní testovanou SH3 doménu proteinu Src.
- Stanovili jsme hodnotu IC₅₀ jako $1,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$.

Souhrnně tyto výsledky dokazují, že N-terminální SH3 doména proteinu Crk je vhodným cílem terapeutické strategie kladoucí si za cíl inhibici invazivity nádorových buněk. Výsledky dále ukazují, že jako nástroj takové terapie by mohl být využit vysokoafinní kompetitivní inhibitor peptoidového základu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Akagi, T., Murata, K., Shishido, T. & Hanafusa, H., 2002, v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway by utilizing focal adhesion kinase and H-Ras, *Molecular and cellular biology*, 22(20), pp. 7015-23.
- Altun-Gultekin, Z.F., 1998, Activation of Rho-Dependent Cell Spreading and Focal Adhesion Biogenesis by the v-Crk Adaptor Protein, *Molecular and cellular biology and cellular biology*, 18(5), pp. 3044-58.
- Barrett, A., Evans, I.M., Frolov, A., Britton, G., Pellet-Many, C., Yamaji, M., Mehta, V., Bandopadhyay, R., Li, N., Brandner, S., Zachary, I.C. & Frankel, P., 2014, A crucial role for DOK1 in PDGF-BB-stimulated glioma cell invasion through p130Cas and Rap1 signalling, *Journal of Cell Science*, 127(15), pp. 3397-.
- Bell, E.S. & Park, M., 2012, Models of crk adaptor proteins in cancer, *Genes & cancer*, 3(5-6), pp. 341-52.
- Birge, R.B. & Hanafusa, H., 1993, Closing in on SH2 specificity, *Science*, 262(5139), pp. 1522-4.
- Birge, R.B. & Kalodimos, C., 2009, Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling, *Cell Commun Idots*, 23, pp. 1-23.
- Brábek, J., Constancio, S.S., Shin, N.-Y., Pozzi, A., Weaver, A.M. & Hanks, S.K., 2004, CAS promotes invasiveness of Src-transformed cells, *Oncogene*, 23(44), pp. 7406-15.
- Brábek, J., Constancio, S.S., Siesser, P.F., Shin, N.-Y., Pozzi, A. & Hanks, S.K., 2005, Crk-associated substrate tyrosine phosphorylation sites are critical for invasion and metastasis of SRC-transformed cells, *Molecular cancer research : MCR*, 3(6), pp. 307-15.
- Brinkman, A., 2000, BCAR1, a Human Homologue of the Adapter Protein p130Cas, and Antiestrogen Resistance in Breast Cancer Cells, *Journal of the National Cancer Institute*, 92(2), pp. 112-20.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Tramont, A.-C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R. & Ravichandran, K.S., 2002, Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex, *Nature cell biology*, 4(8), pp. 574-82.
- Calalb, M.B., Polte, T.R. & Hanks, S.K., 1995, Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases, *Molecular and cellular biology*, 15(2), pp. 954-63.
- Che, Y.-L., Luo, S.-J., Li, G., Cheng, M., Gao, Y.-M., Li, X.-M., Dai, J.-M., He, H., Wang, J., Peng, H.-J., Zhang, Y., Li, W.-Y., Wang, H., Liu, B. & Linghu, H., 2015, The C3G/Rap1 pathway promotes secretion of MMP-2 and MMP-9 and is involved in serous ovarian cancer metastasis, *Cancer letters*, 359(2), pp. 241-9.
- Cheng, S., Guo, J., Yang, Q. & Yang, X., 2015, Crk-like adapter protein regulates CCL19/CCR7-mediated epithelial-to-mesenchymal transition via ERK signaling pathway in epithelial ovarian carcinomas, *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 32(3), p. 47.
- Cheresh, D.A., Leng, J. & Klemke, R.L., 1999, Regulation of Cell Contraction and Membrane Ruffling by Distinct Signals in Migratory Cells, *The Journal of Cell Biology*, 146(5), pp. 1107-16.
- Cho, S.Y. & Klemke, R.L., 2000, Extracellular-Regulated Kinase Activation and Cas/Crk Coupling Regulate Cell Migration and Suppress Apoptosis during Invasion of the Extracellular Matrix, *The Journal of Cell Biology*, 149(1), pp. 223-36.
- Cho, S.Y. & Klemke, R.L., 2002, Purification of pseudopodia from polarized cells reveals redistribution and activation of Rac through assembly of a CAS/Crk scaffold, *The Journal of Cell Biology*, 156(4), pp. 725-36.
- Chodniewicz, D. & Klemke, R.L., 2004, Regulation of integrin-mediated cellular responses through assembly of a CAS/Crk scaffold, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1692(2-3), pp. 63-76.
- Clarke, R., Liu, M.C., Bouker, K.B., Gu, Z., Lee, R.Y., Zhu, Y., Skaar, T.C., Gomez, B., O'Brien, K., Wang, Y. & Hilakivi-Clarke, L.A., 2003, Antiestrogen resistance in breast cancer and the role of estrogen receptor signaling, *Oncogene*, 22(47), pp. 7316-39.
- Cowell, L.N., Graham, J.D., Bouton, A.H., Clarke, C.L. & O'Neill, G.M., 2006, Tamoxifen treatment promotes phosphorylation of the adhesion molecules, p130Cas/BCAR1, FAK and Src, via an adhesion-dependent pathway, *Oncogene*, 25(58), pp. 7597-607.
- Crawford, M., Brawner, E., Batte, K., Yu, L., Hunter, M.G., Otterson, G.A., Nuovo, G., Marsh, C.B. & Nana-Sinkam, S.P., 2008, MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines, *Biochemical and biophysical research communications*, 373(4), pp. 607-12.
- Dai, Y., Qi, L., Zhang, X., Li, Y., Chen, M. & Zu, X., 2011, CrkI and p130(Cas) complex regulates the migration and invasion of prostate cancer cells, *Cell biochemistry and function*, 29(8), pp. 625-9.

- Dolfi, F., Garcia-Guzman, M., Ojaniemi, M., Nakamura, H., Matsuda, M. & Vuori, K., 1998, The adaptor protein Crk connects multiple cellular stimuli to the JNK signaling pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), pp. 15394-9.
- Dorssers, L.C.J. & Flier, S.V.D., 2001, Tamoxifen Resistance in Breast Cancer, *Drugs*, 61(12), pp. 1721-33.
- Ebrahimi, F., Gopalan, V., Smith, R.A. & Lam, A.K.-Y., 2014, miR-126 in human cancers: clinical roles and current perspectives, *Experimental and molecular pathology*, 96(1), pp. 98-107.
- Fathers, K.E., Bell, E.S., Rajadurai, C.V., Cory, S., Zhao, H., Mourskaia, A., Zuo, D., Madore, J., Monast, A., Mes-Masson, A.-M., Grosset, A.-A., Gaboury, L., Hallet, M., Siegel, P. & Park, M., 2012, Crk adaptor proteins act as key signaling integrators for breast tumorigenesis, *Breast cancer research : BCR*, 14(3), p. R74.
- Feller, S.M., 2001, Crk family adaptors - signalling complex formation and biological roles, *Oncogene*.
- Feller, S.M. & Lewitzky, M., 2006, Potential disease targets for drugs that disrupt protein-- protein interactions of Grb2 and Crk family adaptors, *Current pharmaceutical design*, 12(5), pp. 529-48.
- Feller, S.M., Posern, G. & Voss, J., 1998, Physiological signals and oncogenesis mediated through Crk family adapter proteins, *Journal of cellular physiology*, 552(August), pp. 535-52.
- Feller, S.M., Ren, R., Hanafusa, H. & Baltimore, D., 1994, SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl, *Trends in biochemical sciences*, pp. 453-8.
- Feng, H., Hu, B., Liu, K.W., Li, Y. & Lu, X., 2011, Activation of Rac1 by Src-dependent phosphorylation of Dock180Y1811 mediates PDGFR α -stimulated glioma tumorigenesis in mice and humans, *The Journal of clinical Idots*, 121(12).
- Feng, R., Chen, X., Yu, Y., Su, L., Yu, B., Li, J., Cai, Q., Yan, M., Liu, B. & Zhu, Z., 2010, miR-126 functions as a tumour suppressor in human gastric cancer, *Cancer letters*, 298(1), pp. 50-63.
- Garcia-Guzman, M., Dolfi, F., Zeh, K. & Vuori, K., 1999, Met-induced JNK activation is mediated by the adapter protein Crk and correlates with the Gab1 - Crk signaling complex formation, *Oncogene*, 18(54), pp. 7775-86.
- Gemperle J. Hledán\i nových interakčn\ich partnerů SH3 domény adaptorového proteinu p130Cas, in *Univerzita Karlova v Praze Př\írodov\vedecká fakulta* (2012).
- Guo, C., Liu, S. & Sun, M.-Z., 2014, The role of CT10 regulation of kinase-like in cancer, *Future oncology* (London, England), 10(16), pp. 2687-97.
- Hasegawa, H. & Kiyokawa, E., 1996, DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane, *Idots and cellular biology*.
- Hasegawa, H., Senga, T., Ito, S., Iwamoto, T. & Hamaguchi, M., 2009, A role for AP-1 in matrix metalloproteinase production and invadopodia formation of v-Crk-transformed cells, *Experimental cell research*, 315(8), pp. 1384-92.
- Honda, H., Nakamoto, T., Sakai, R. & Hirai, H., 1999, p130(Cas), an assembling molecule of actin filaments, promotes cell movement, cell migration, and cell spreading in fibroblasts, *Biochemical and biophysical research communications*, 262(1), pp. 25-30.
- Huang, C.Y., Uno, T., Murphy, J.E. & Lee, S., 1998, Lipitoids—novel cationic lipids for cellular delivery of plasmid DNA in vitro, *Chemistry & biology*.
- Huang, M., Anand, S., Murphy, E.A., Desgrosellier, J.S., Stupack, D.G., Shattil, S.J., Schlaepfer, D.D. & Cheresch, D.A., 2012, EGFR-dependent pancreatic carcinoma cell metastasis through Rap1 activation, *Oncogene*, 31(22), pp. 2783-93.
- Jankowski, W., Saleh, T., Pai, M.-T., Sriram, G., Birge, R.B. & Kalodimos, C.G., 2012, Domain organization differences explain Bcr-Abl's preference for CrkL over CrkII, *Nature chemical biology*, 8(6), pp. 590-6.
- Jano\vstiak, R., Tolde, O., Brůhová, Z., Novotný, M., Hanks, S.K., Rösel, D. & Brábek, J., 2011, Tyrosine phosphorylation within the SH3 domain regulates CAS subcellular localization, cell migration, and invasiveness, *Molecular biology of the cell*, 22(22), pp. 4256-67.
- de Jong, R., ten Hoeve, J., Heisterkamp, N. & Groffen, J., 1997, Tyrosine 207 in CRKL is the BCR/ABL phosphorylation site, *Oncogene*, 14(5), pp. 507-13.
- Kain, K.H., Gooch, S. & Klemke, R.L., 2003, Cytoplasmic c-Abl provides a molecular 'Rheostat' controlling carcinoma cell survival and invasion, *Oncogene*, 22(38), pp. 6071-80.
- Kardinal, C., Konkol, B. & Schulz, A., 2000, Cell-penetrating SH3 domain blocker peptides inhibit proliferation of primary blast cells from CML patients, *The FASEB Journal*, pp. 1529-38.
- Kardinal, C., Konkol, B., Lin, H. & Eulitz, M., 2001, Chronic myelogenous leukemia blast cell proliferation is inhibited by peptides that disrupt Grb2-SoS complexes, *Blood*, 98(6), pp. 1773-82.
- Kiyokawa, E., Hashimoto, Y., Kobayashi, S., Sugimura, H., Kurata, T. & Matsuda, M., 1998, Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180, *Genes & Development*, 12(21), pp. 3331-6.

- Klemke, R.L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P.C., Vuori, K. & Cheres, D.A., 1998, CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration, *The Journal of Cell Biology*, 140(4), pp. 961-72.
- Knudsen, B.S., Feller, S.M. & Hanafusa, H., 1994, Four proline-rich sequences of the guanine-nucleotide exchange factor C3G bind with unique specificity to the first Src homology 3 domain of Crk, *The Journal of biological chemistry*, 269(52), pp. 32781-7.
- Knudsen, B.S., Zheng, J., Feller, S.M., Mayer, J.P., Burrell, S.K., Cowburn, D. & Hanafusa, H., 1995, Affinity and specificity requirements for the first Src homology 3 domain of the Crk proteins, *The EMBO journal*, 14(10), pp. 2191-8.
- Kobashigawa, Y. & Inagaki, F., 2012, CrkL is not Crk-like, *Nature chemical biology*, 8(6), pp. 504-5.
- Koptiya, M., Park, T.-J. & Curran, T., 2015, Crk and CrkL are required for cell transformation by v-fos and v-ras, *Molecular carcinogenesis*.
- Lawrenson, I.D., Wimmer-Kleikamp, S.H., Lock, P., Schoenwaelder, S.M., Down, M., Boyd, A.W., Alewood, P.F. & Lackmann, M., 2002, Ephrin-A5 induces rounding, blebbing and de-adhesion of EphA3-expressing 293T and melanoma cells by CrkII and Rho-mediated signalling, *Journal of cell science*, 115(Pt 5), pp. 1059-72.
- Li, X., Shen, Y., Ichikawa, H., Antes, T. & Goldberg, G.S., 2009, Regulation of miRNA expression by Src and contact normalization: effects on nonanchored cell growth and migration, *Oncogene*, 28(48), pp. 4272-83.
- Li, X., Wang, F. & Qi, Y., 2014, MiR-126 inhibits the invasion of gastric cancer cell in part by targeting Crk, *European review for medical and pharmacological sciences*, 18(14), pp. 2031-7.
- Linghu, H., Tsuda, M., Makino, Y., Sakai, M., Watanabe, T., Ichihara, S., Sawa, H., Nagashima, K., Mochizuki, N. & Tanaka, S., 2006, Involvement of adaptor protein Crk in malignant feature of human ovarian cancer cell line MCAS, *Oncogene*, 25(25), pp. 3547-56.
- Liotta, L.A., Tryggvason, K., Garbisa, S. & Hart, I., 1980, Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen, *Nature*, 284, pp. 67-8.
- Liu, E., Thant, A.A., Kikkawa, F. & Kurata, H., 2000, The Ras-Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Is Critical for the Activation of Matrix Metalloproteinase Secretion and the Invasiveness in v- crk -transformed 3Y1, *Cancer research*, pp. 2361-4.
- Liu, L.Y., Wang, W., Zhao, L.Y., Guo, B., Yang, J., Zhao, X.G., Hou, N., Ni, L., Wang, A.Y., Song, T.S., Huang, C. & Xu, J.R., 2014, Mir-126 inhibits growth of SGC-7901 cells by synergistically targeting the oncogenes PI3KR2 and Crk, and the tumor suppressor PLK2, *International journal of oncology*, 45(3), pp. 1257-65.
- Lv, S., Qin, J., Yi, R., Coreman, M., Shi, R., Kang, H. & Yao, C., 2013, CrkL efficiently mediates cell proliferation, migration, and invasion induced by TGF-beta pathway in glioblastoma, *Journal of molecular neuroscience : MN*, 51(3), pp. 1046-51.
- Martinez-Quiles, N., Feuerbacher, L.A., Benito-Leon, M. & Hardwidge, P.R., 2014, Contribution of Crk adaptor proteins to host cell and bacteria interactions, *BioMed research international*, 2014, p. 372901.
- Matsuda, M., Hashimoto, Y., Muroya, K., Hasegawa, H., Kurata, T., Tanaka, S., Nakamura, S. & Hattori, S., 1994, CRK protein binds to two guanine nucleotide-releasing proteins for the Ras family and modulates nerve growth factor-induced activation of Ras in PC12 cells, *Molecular and cellular biology*, 14(8), pp. 5495-500.
- Matsuda, M., Mayer, B.J. & Hanafusa, H., 1991, Identification of domains of the v-crk oncogene product sufficient for association with phosphotyrosine-containing proteins, *Molecular and cellular biology*, 11(3), pp. 1607-13.
- Matsuda, M., Tanaka, S., Nagata, S., Kojima, A., Kurata, T. & Shibuya, M., 1992, Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities, *Molecular and cellular biology*, 12(8), pp. 3482-9.
- Mayer, B.J., 2001, SH3 domains: complexity in moderation, *Journal of cell science*, 2.
- Mayer, B.J. & Hanafusa, H., 1990, Mutagenic analysis of the v-crk oncogene: requirement for SH2 and SH3 domains and correlation between increased cellular phosphotyrosine and transformation, *Journal of virology*, 64(8), pp. 3581-9.
- Mayer, B.J., Hamaguchi, M. & Hanafusa, H., 1988, A novel viral oncogene with structural similarity to phospholipase C, *Nature*, 332(6161), pp. 272-5.
- Meenderink, L.M., Ryzhova, L.M., Donato, D.M., Gochberg, D.F., Kaverina, I. & Hanks, S.K., 2010, P130Cas Src-binding and substrate domains have distinct roles in sustaining focal adhesion disassembly and promoting cell migration, *PloS one*, 5(10), p. e13412.
- Miller, C.T., Chen, G., Gharib, T.G., Wang, H., Thomas, D.G., Misek, D.E., Giordano, T.J., Yee, J., Orringer, M.B., Hanash, S.M. & Beer, D.G., 2003, Increased C-CRK proto-oncogene expression is associated with an aggressive phenotype in lung adenocarcinomas, *Oncogene*, 22(39), pp. 7950-7.

- Mortazavi, F., Dubinett, S. & Rettig, M., 2011, c-Crk proto-oncogene contributes to transcriptional repression of p120-catenin in non-small cell lung cancer cells, *Clinical & experimental metastasis*, 28(4), pp. 391-404.
- Muralidharan, V., Dutta, K., Cho, J., Vila-Perello, M., Raleigh, D.P., Cowburn, D. & Muir, T.W., 2006, Solution structure and folding characteristics of the C-terminal SH3 domain of c-Crk-II, *Biochemistry*, 45(29), pp. 8874-84.
- Musacchio, A., 2002, How SH3 domains recognize proline, *Advances in protein chemistry*, 61.
- Nakamoto, T., Yamagata, T., Sakai, R., Ogawa, S., Honda, H., Ueno, H., Hirano, N., Yazaki, Y. & Hirai, H., 2000, CIZ, a zinc finger protein that interacts with p130(cas) and activates the expression of matrix metalloproteinases, *Molecular and cellular biology*, 20(5), pp. 1649-58.
- Natsume, H., Shinmura, K., Tao, H., Igarashi, H., Suzuki, M., Nagura, K., Goto, M., Yamada, H., Maeda, M., Konno, H., Nakamura, S. & Sugimura, H., 2012, The CRKL gene encoding an adaptor protein is amplified, overexpressed, and a possible therapeutic target in gastric cancer, *Journal of Translational Medicine*, 10(1), p. 97.
- Nguyen, J.T., 1998, Exploiting the Basis of Proline Recognition by SH3 and WW Domains: Design of N-Substituted Inhibitors, *Science*, 282(5396), pp. 2088-92.
- Nguyen, J.T., Porter, M., Amoui, M., Miller, W.T., Zuckermann, R.N. & Lim, W.A., 2000, Improving SH3 domain ligand selectivity using a non-natural scaffold, *Chemistry & biology*, 7(7), pp. 463-73.
- Nishihara, H., Tanaka, S., Tsuda, M., Oikawa, S., Maeda, M., Shimizu, M., Shinomiya, H., Tanigami, A., Sawa, H. & Nagashima, K., 2002, Molecular and immunohistochemical analysis of signaling adaptor protein Crk in human cancers, *Cancer letters*, 180(1), pp. 55-61.
- Park, T.-J. & Curran, T., 2008, Crk and Crk-like play essential overlapping roles downstream of disabled-1 in the Reelin pathway, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(50), pp. 13551-62.
- Park, T.-J. & Curran, T., 2014, Essential roles of Crk and CrkL in fibroblast structure and motility, *Oncogene*, 33(43), pp. 5121-32.
- Patil, P.N., 1996, Pharmacologic quantitation, *Indian journal of experimental biology*, 34(7), pp. 615-33.
- Pezeskhpour, G.H., Moatamed, F., Lewis, M., Hoang, B., Rettig, M. & Mortazavi, F., 2013, CRK SH3N Domain Diminishes Cell Invasiveness of Non-Small Cell Lung Cancer, *Genes & cancer*, 4(7-8), pp. 315-24.
- Polte, T.R. & Hanks, S.K., 1995, Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(23), pp. 10678-82.
- Posern, G., Rapp, U.R. & Feller, S.M., 2000, The Crk signaling pathway contributes to the bombesin-induced activation of the small GTPase Rap1 in Swiss 3T3 cells, *Oncogene*, 19(54), pp. 6361-8.
- Posern, G., Zheng, J., Knudsen, B.S., Kardinal, C., Müller, K.B., Voss, J., Shishido, T., Cowburn, D., Cheng, G., Wang, B., Kruh, G.D., Burrell, S.K., Jacobson, C.A., Lenz, D.M., Zamborelli, T.J., Adermann, K., Hanafusa, H. & Feller, S.M., 1998, Development of highly selective SH3 binding peptides for Crk and CRKL which disrupt Crk-complexes with DOCK180, SoS and C3G, *Oncogene*, 16(15), pp. 1903-12.
- Pratt, S.J., Eppe, H., Ward, M., Feng, Y., Braga, V.M. & Longmore, G.D., 2005, The LIM protein Ajuba influences p130Cas localization and Rac1 activity during cell migration, *The Journal of cell biology*, 168(5), pp. 813-24.
- Prosser, S., Sorokina, E., Pratt, P. & Sorokin, A., 2003, CrkIII: a novel and biologically distinct member of the Crk family of adaptor proteins, *Oncogene*, 22(31), pp. 4799-806.
- Reichman, C.T. & Mayer, B.J., 1992, The Product of the Cellular crk Gene Consists Primarily of SH2 and SH3 Regions, *Cell growth & differentiation*, 3(July), pp. 451-60.
- Ridley, A.J., 2001, Rho GTPases and cell migration, *Journal of cell science*, 114(Pt 15), pp. 2713-22.
- Rivera, G.M., Antoku, S., Gelkop, S., Shin, N.Y., Hanks, S.K., Pawson, T. & Mayer, B.J., 2006, Requirement of Nck adaptors for actin dynamics and cell migration stimulated by platelet-derived growth factor B, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), pp. 9536-41.
- Rodrigues, S.P., Fathers, K.E., Chan, G., Zuo, D., Halwani, F., Meterissian, S. & Park, M., 2005, CrkI and CrkII function as key signaling integrators for migration and invasion of cancer cells, *Molecular cancer research : MCR*, 3(4), pp. 183-94.
- Sakai, R., Iwamatsu, A., Hirano, N., Ogawa, S., Tanaka, T., Mano, H., Yazaki, Y. & Hirai, H., 1994, A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner, *The EMBO journal*, 13(16), pp. 3748-56.
- Saksela, K. & Permi, P., 2012, SH3 domain ligand binding: What's the consensus and where's the specificity? *FEBS letters*, 586(17), pp. 2609-14.

- Sattler, M. & Salgia, R., 1998, Role of the adapter protein CRKL in signal transduction of normal hematopoietic and BCR/ABL-transformed cells, *Leukemia*(January), pp. 637-44.
- Sattler, M., Salgia, R., Shrikhande, G., Verma, S., Pisick, E., Prasad, K.V. & Griffin, J.D., 1997, Steel factor induces tyrosine phosphorylation of CRKL and binding of CRKL to a complex containing c-kit, phosphatidylinositol 3-kinase, and p120(CBL), *The Journal of biological chemistry*, 272(15), pp. 10248-53.
- Schmidt, N., Mishra, A., Lai, G.H. & Wong, G.C.L., 2010, Arginine-rich cell-penetrating peptides, *FEBS letters*, 584(9), pp. 1806-13.
- Senechal, K., Halpern, J. & Sawyers, C.L., 1996, The CRKL adaptor protein transforms fibroblasts and functions in transformation by the BCR-ABL oncogene, *The Journal of biological chemistry*, 271(38), pp. 23255-61.
- Shin, N.-Y., Dise, R.S., Schneider-Mergener, J., Ritchie, M.D., Kilkenny, D.M. & Hanks, S.K., 2004, Subsets of the major tyrosine phosphorylation sites in Crk-associated substrate (CAS) are sufficient to promote cell migration, *The Journal of biological chemistry*, 279(37), pp. 38331-7.
- Smith, H.W., Marra, P. & Marshall, C.J., 2008, uPAR promotes formation of the p130Cas-Crk complex to activate Rac through DOCK180, *The Journal of cell biology*, 182(4), pp. 777-90.
- Smithgall, T.E., 1995, SH2 and SH3 domains: potential targets for anti-cancer drug design, *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 34(3), pp. 125-32.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M. & Gish, G., 1993, SH2 Domains Recognize Specific Phosphopeptide Sequences, *Cell*, 72, pp. 767-76.
- Soni, S., Lin, B.-T., August, A., Nicholson, R.I. & Kirsch, K.H., 2009, Expression of a phosphorylated p130(Cas) substrate domain attenuates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt survival pathway in tamoxifen resistant breast cancer cells, *Journal of cellular biochemistry*, 107(2), pp. 364-75.
- Sparks, A.B., Rider, J.E., Hoffman, N.G., Fowlkes, D.M., Quillam, L.A. & Kay, B.K., 1996, Distinct ligand preferences of Src homology 3 domains from Src, Yes, Abl, Cortactin, p53bp2, PLCgamma, Crk, and Grb2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(4), pp. 1540-4.
- Sriram, G. & Birge, R.B., 2010, Emerging roles for crk in human cancer, *Genes & cancer*, 1(11), pp. 1132-9.
- Sriram, G. & Birge, R.B., 2012, Commentary: The carboxyl-terminal Crk SH3 domain: Regulatory strategies and new perspectives, *FEBS letters*, 586(17), pp. 2615-8.
- Sriram, G., Jankowski, W., Kasikara, C., Reichman, C., Saleh, T., Nguyen, K.-Q., Li, J., Hornbeck, P., Machida, K., Liu, T., Li, H., Kalodimos, C.G. & Birge, R.B., 2014, Iterative tyrosine phosphorylation controls non-canonical domain utilization in Crk, *Oncogene*(September), pp. 1-10.
- Sriram, G., Reichman, C., Tunceroglu, A., Kaushal, N., Saleh, T., Machida, K., Mayer, B., Ge, Q., Li, J., Hornbeck, P., Kalodimos, C.G. & Birge, R.B., 2011, Phosphorylation of Crk on tyrosine 251 in the RT loop of the SH3C domain promotes Abl kinase transactivation, *Oncogene*, 30(46), pp. 4645-55.
- Takino, T., Nakada, M. & Miyamori, H., 2003, CrkI Adapter Protein Modulates Cell Migration and Invasion in Glioblastoma, *Cancer research*, pp. 2335-7.
- Tavazoie, S.F., Alarcón, C., Oskarsson, T., Padua, D., Wang, Q., Bos, P.D., Gerald, W.L. & Massagué, J., 2008, Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis, *Nature*, 451(7175), pp. 147-52.
- ten Hoeve, J., Morris, C., Heisterkamp, N. & Groffen, J., 1993, Isolation and chromosomal localization of CRKL, a human crk-like gene, *Oncogene*, 8(9), pp. 2469-74.
- Tikhmyanova, N., Little, J.L. & Golemis, E.A., 2010, CAS proteins in normal and pathological cell growth control, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(7), pp. 1025-48.
- Tsuchie, H., Chang, C.H., Yoshida, M. & Vogt, P.K., 1989, A newly isolated avian sarcoma virus, ASV-1, carries the crk oncogene, *Oncogene*, 4(11), pp. 1281-4.
- Tsuda, M. & Tanaka, S., 2012, Roles for crk in cancer metastasis and invasion, *Genes & cancer*, 3, pp. 334-40.
- Tsuda, M., Makino, Y., Iwahara, T., Nishihara, H., Sawa, H., Nagashima, K., Hanafusa, H. & Tanaka, S., 2004, Crk associates with ERM proteins and promotes cell motility toward hyaluronic acid, *The Journal of biological chemistry*, 279(45), pp. 46843-50.
- Tsuda, M., Tanaka, S., Sawa, H., Hanafusa, H. & Nagashima, K., 2002, Signaling adaptor protein v-Crk activates Rho and regulates cell motility in 3Y1 rat fibroblast cell line, *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 13(3), pp. 131-9.
- Uemura, N. & Griffin, J.D., 1999, The adapter protein Crkl links Cbl to C3G after integrin ligation and enhances cell migration, *The Journal of biological chemistry*, 274(53), pp. 37525-32.

- Vidal, M., Gigoux, V. & Garbay, C., 2001, SH2 and SH3 domains as targets for anti-proliferative agents, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 40(2), pp. 175-86.
- Vives, E., Brodin, P. & Lebleu, B., 1997, A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly Translocates through the Plasma Membrane and Accumulates in the Cell Nucleus, *Journal of Biological Chemistry*, 272(25), pp. 16010-7.
- Wang, H., Linghu, H., Wang, J., Che, Y.-L., Xiang, T.-X., Tang, W.-X. & Yao, Z.-W., 2010, The role of Crk/Dock180/Rac1 pathway in the malignant behavior of human ovarian cancer cell SKOV3, *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 31(1), pp. 59-67.
- Wang, J., Che, Y.-L., Li, G., Liu, B., Shen, T.-M., Wang, H. & Linghu, H., 2011, Crk and CrkL present with different expression and significance in epithelial ovarian carcinoma, *Molecular carcinogenesis*, 50(7), pp. 506-15.
- Wang, J., Chen, X., Li, P., Su, L., Yu, B., Cai, Q., Li, J., Yu, Y., Liu, B. & Zhu, Z., 2013b, CRKL promotes cell proliferation in gastric cancer and is negatively regulated by miR-126, *Chemico-biological interactions*, 206(2), pp. 230-8.
- Wang, L., Tabu, K., Kimura, T., Tsuda, M., Linghu, H., Tanino, M., Kaneko, S., Nishihara, H. & Tanaka, S., 2007, Signaling adaptor protein Crk is indispensable for malignant feature of glioblastoma cell line KMG4, *Biochemical and biophysical research communications*, 362(4), pp. 976-81.
- Wang, Y., Dong, Q.-Z., Fu, L., Stoecker, M., Wang, E. & Wang, E.-H., 2013a, Overexpression of crkl correlates with poor prognosis and cell proliferation in non-small cell lung cancer, *Molecular Carcinogenesis*, 52(11), pp. 890-9.
- Watanabe, K., Emoto, N., Hamano, E., Sunohara, M., Kawakami, M., Kage, H., Kitano, K., Nakajima, J., Goto, A., Fukayama, M., Nagase, T., Yatomi, Y., Ohishi, N. & Takai, D., 2012, Genome structure-based screening identified epigenetically silenced microRNA associated with invasiveness in non-small-cell lung cancer, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 130(11), pp. 2580-90.
- Watanabe, T., Tsuda, M., Makino, Y., Ichihara, S., Sawa, H., Minami, A., Mochizuki, N., Nagashima, K. & Tanaka, S., 2006, Adaptor molecule Crk is required for sustained phosphorylation of Grb2-associated binder 1 and hepatocyte growth factor-induced cell motility of human synovial sarcoma cell lines, *Molecular cancer research : MCR*, 4(7), pp. 499-510.
- Watanabe, T., Tsuda, M., Makino, Y., Konstantinou, T., Nishihara, H., Majima, T., Minami, A., Feller, S.M. & Tanaka, S., 2009, Crk adaptor protein-induced phosphorylation of Gab1 on tyrosine 307 via Src is important for organization of focal adhesions and enhanced cell migration, *Cell research*, 19(5), pp. 638-50.
- White, D., Saunders, V., Grigg, A., Arthur, C., Filshie, R., Leahy, M.F., Lynch, K., To, L.B. & Hughes, T., 2007, Measurement of in vivo BCR-ABL kinase inhibition to monitor imatinib-induced target blockade and predict response in chronic myeloid leukemia, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(28), pp. 4445-51.
- Wu, X., Knudsen, B., Feller, S.M., Zheng, J., Sali, A., Cowburn, D., Hanafusa, H., Kuriyan & J., 1995, Structural basis for the specific interaction of lysine-containing proline-rich peptides with the N-terminal SH3 domain of c-Crk, *Structure*, 3, pp. 215-26.
- Yamada, S.-I., Yanamoto, S., Kawasaki, G., Rokutanda, S., Yonezawa, H., Kawakita, A. & Nemoto, T.K., 2011, Overexpression of CRKII increases migration and invasive potential in oral squamous cell carcinoma, *Cancer letters*, 303(2), pp. 84-91.
- Yanagi, H., Wang, L., Nishihara, H., Kimura, T., Tanino, M., Yanagi, T., Fukuda, S. & Tanaka, S., 2012, CRKL plays a pivotal role in tumorigenesis of head and neck squamous cell carcinoma through the regulation of cell adhesion, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418(1), pp. 104-9.
- Yao, C., Lv, S., Han, M., Zhang, J., Zhang, Y., Zhang, L., Yi, R., Zhuang, D. & Wu, J., 2014, The association of Crk-like adapter protein with poor prognosis in glioma patients, *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(6), pp. 5695-700.
- Yeung, C.L., Ngo, V.N., Grohar, P.J., Arnaldez, F.I., Asante, A., Wan, X., Khan, J., Hewitt, S.M., Khanna, C., Staudt, L.M. & Helman, L.J., 2013, Loss-of-function screen in rhabdomyosarcoma identifies CRKL-YES as a critical signal for tumor growth, *Oncogene*, 32(47), pp. 5429-38.
- Zhao, T., Miao, Z., Wang, Z., Xu, Y., Wu, J., Liu, X., You, Y. & Li, J., 2013, Overexpression of CRKL correlates with malignant cell proliferation in breast cancer, *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 34(5), pp. 2891-7.